



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***"Vectores baculovirales combinados:
exposición superficial de antígenos
y transducción de genes"***

Tesista: Lic. Matías Luis Pidre

Director: Prof. Dr. Víctor Romanowski

Año: 2017

"Vectores baculovirales combinados: exposición superficial de antígenos y transducción de genes"



DESIGN IS WHERE SCIENCE & ART BREAK EVEN.
ROBIN MATTHEW



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Lic. Matías Luis Pidre
Director: Dr. Víctor Romanowski

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Víctor Romanowski.

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por posibilitarme realizar el Doctorado dentro del ámbito de la institución.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) por brindarme la infraestructura y el ámbito necesarios para el desarrollo del presente trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED-CONICET-UBA) por el trabajo en colaboración y la ayuda brindada en los experimentos con modelos animales.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas.

Al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por la extensión de dedicación en el cargo de Ayudante Diplomado que desempeño, en el marco del Programa de Retención de Recursos Humanos, en el último tramo de mi trabajo de tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el otorgamiento de la financiación necesaria para el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos

A la ciencia y la educación pública, ese tesoro que debemos honrar y proteger.

A Víctor. Por creer en mí desde el primer minuto en el que aparecí en el laboratorio. Por permitirme desarrollar mis ideas. Por dejarme ser y ayudarme a construir el pensamiento crítico. Por haber estado ahí en mis primeros pasos como docente. Por la dirección de esta tesis y por toda la ayuda al corregirla. Por la paciencia en mis momentos de crisis existencial. Por permitirme formar parte de este grupo humano tan lindo. Gracias!!!

A Ricardo. Por sus aportes en el área de inmunología y su ayuda en la planificación de los experimentos.

A mis compañeros de Virus Animales. Ellos son sin duda los responsables de que esto esté sucediendo. Gracias infinitas por las cachetadas a tiempo. Por haberse vuelto mi segunda familia y por hacer del trabajo diario algo tan divertido y placentero.

A Maia. Gracias por ser mi gran amiga. Por inspirarme, por estar ahí siempre. Por entendernos sólo con la mirada y por haberme hecho reír incluso en los momentos más difíciles. Te adoro!

A Emi. Por tu amistad incondicional. Por esa locura hermosa que compartimos. Por ser una de las personas más valiosas que me dejó el doctorado. Por toda tu ayuda en los momentos más difíciles y por haber compartido tantos momentos felices. Gracias Emi, de corazón, gracias!

A Noe. Mandi querida! Gracias por todo amiga! Gracias por todas las risas y los momentos compartidos. Por nuestros códigos, nuestros viajes en auto, nuestras desafinadas. Por el gran repertorio de canciones de VA que quedaron en la historia!

A Leti. Por su dulzura, por esa paz interior que contagia (salvo cuando supera el umbral jajaja). Gracias Le por ser tan buena persona y por haber estado ahí siempre para aconsejarme. Por convencerme de seguir “jugando con ustedes mientras encima nos pagan por eso”. Por la inmensa ayuda cada vez que el hada de la tesis pasó por tu oficina. Te quiero mucho Leti!

A Caro. Gracias por esta amistad tan linda que tenemos. Por haberla luchado tanto hasta que conseguimos entendernos. Porque nosotros somos amigos, no

por las circunstancias, sino porque lo elegimos! Gracias por todos los momentos, por las decisiones impulsivas, por tus consejos y por ese corazón de oro que tenés!

A Gabi. Pretre!!! Gracias por tu amistad. Gracias por esa locura contagiosa y por estar presente aún en la distancia. Por tantas frases célebres y por tu risa contagiosa. Te extraño Pretre!!!

A Santi. Por haber sido mi compañero de ruta en todo este trayecto. Por estar ahí siempre que te necesité. Por los consejos, las risas. Por todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. Por el nacimiento del orco, la sepultura del Hepa, el “come over here”. Gracias Santi, y buena vida en esta nueva aventura!!!

A Agus y Lau. Gracias por todo lo que hacen por mí y por todos. Por su ayuda incondicional en esta etapa tan linda pero tan difícil. Gracias por la energía que le pusieron al Labo desde que llegaron, por pensar siempre en grupo y por todas las juntadas. Por el pollo al curry, los asados, el sushi. Gracias por haber intervenido cuando no podía ver con claridad y por convencerme para no bajar los brazos. A Dougui y a Liam, por ser los más chiquitos de VA y los mimados por todos los tíos postizos.

A Laurita. La primera alumna con la que hablé mi primer día como docente y hoy una gran amiga. Gracias Lau por haber sido parte de esta última etapa de la tesis. Por haberme acompañado tanto, incluso domingos y feriados! Sos una gran persona y a darle con todo que la próxima Doc del grupo sos vos!

A Pau. A la VA más joven hasta el momento. Gracias Pau por tu energía, por tener esas pilas y esa curiosidad extrema. Gracias por haber compartido la etapa de escritura juntos. Por esa locura capricorniana que nos une. Gracias por tu amistad y por todos los momentos compartidos (y por la jalea!).

A Tomi, Flor, Jesi, Sofi y Leslie por haberme acompañado en este proceso y haberme bancado en mis días de locura. A Mauro por haber confiado en mí para ser su tutor, por su franqueza y su buena onda. Recibite!!!

A Lucre. Gracias por todos los momentos que compartimos. Por las risas, las juntadas. Te extraño tana Alberdi!

A los VA de antes, con los que me crucé muy poco en el lab pero mucho afuera. A Ale, gracias por esa energía positiva que le ponés a todo, por las juntadas, la comida riquísima con la que nos alimentaste a todos. Al gran Luca, un genio!

A Ricky y Fer, gracias por todos los momentos que compartimos juntos.

A Caty. Por inundar siempre nuestra oficina de buena energía, por pensar siempre en nosotros y ayudarnos en lo que esté a su alcance. Gracias por todo!

A todos los CPA, por la ayuda recibida todos estos años. Sin ustedes nuestro trabajo sería tremendamente cuesta arriba. A los CP sin A, por ser mis amigos, esa gente linda con los que compartí tantos momentos lindos. A Sil y Abel, mis padres platenses. Gracias por compartir la misma locura. Por el vinito de los lunes, por los sueños compartidos que en algún momento haremos realidad. A Saritah, mi futura sobrina piquetera! A Pau, gracias por esa amistad tan linda, por tu sinceridad y tu alegría. Por hacerme reír tanto con tus enojos. A Lu, mi alma gemela de la higiene. Que digan lo que quieran, los pulcros como nosotros nos entendemos! Por la cantidad de veces que aún estando abrumado me hiciste reír con tus chistes y exabruptos. A Lari, gracias por todo. Por la ayuda, por la paciencia con mi faceta abandonica de células. Por haberme dejado compartir con vos tantos momentos lindos. A Claudio y Juan gracias por la buena onda de todos los días. A Maga, por el activismo compartido.

A Gise y a Juli. Gracias por estar ahí siempre que necesité una mano. Por hacerme reír tanto, por todos los momentos compartidos en el comedor y el cuartito. Gracias, gracias! A Andre, por hacer de nuestro lugar de trabajo un lugar más lindo todos los días. Por los mates, por el cariño. Al resto de los chicos que alguna vez han rotado por el IBBM, gracias por todo.

A los RPS, uno de nuestros laboratorios hermanos. Gracias a todos por ser excelentes compañeros, por alojarnos en momentos de tormenta y compartir tantos lindos momentos. A Piru, gracias por todo, por toda la ayuda, por pensar siempre en los demás. Sos una gran persona Piru! A Charly, por hacerme reír incluso a la distancia, por haberme ayudado a simplificar y avanzar, por el viaje a Perú que nos debemos. A Fran, por su locura, sus imitaciones, y los maravillosos memes, si sentís olor a azufre corré! A Yuli "La Yula" Nilsson, gracias por ser el alma de los festejos con tu alegría. A Ile por haber compartido esta etapa final juntos. A Moni, por las charlas, los consejos y la buena energía siempre. A Jose, por ser tan personaje, por ser el responsable de mi amor por el ukelele, gracias por todos los momentos divertidos. A Angie, por todos los consejos, el cariño y los lindos momentos compartidos dando clases. A Mauri, Flor (Jensen), Walter, Lucas, Gonzalo, Florencia, Mariano y Tony.

A los R3, gracias por la buena onda. A Florcita, mi compañera de fórmula. Gracias por tu amistad y por cada uno de los momentos que vivimos juntos. Hasta la casa rosada no paramos López! A Julia, gracias por la buena onda de siempre, por todos los momentos compartidos y por todo el apoyo en la cátedra. A Chandru, gracias por tu amistad, por haberme permitido vivir una de las experiencias más lindas de mi vida. A Mathy y Vishakan. A los R3citos, Lamel, Mengu, Vale, Caro y Esteban. Gracias por su energía, por ponerle siempre buena onda a las fiestas, por ser así de personajes. Gracias a Gabi, Jota, Nacho, Elías, Pity y Aníbal.

A los R4, gracias por todos los momentos compartidos. A Priscila, gracias por las charlas, los consejos, por ese amor compartido por el sur y por la India! A Meli, Anita, Caro, Marcos, Joaquín, Efrén, Karen, Sole, Carla y Claudio.

A los VacSal, los compañeros de lucha del IBBM. Gracias por todos los momentos compartidos. A Eri por tu apoyo incondicional, por estar ahí siempre preocupándose por todos. Por la ayuda en los momentos que más la necesité. Por los oídos y los hombros. Gracias Bartel! A Fran, por las luchas compartidas, por los puños levantados. A Emi, Nico, Zuri y Dani por todos los momentos compartidos. A Paz, Sol y Daniela.

A los VV, nuestro segundo laboratorio hermano. Gracias por la ayuda, los reactivos, el lugar en los freezers. Por los seminarios conjuntos que ya van a volver! A Agus, por ser mi gran amiga. Por estar casi tan loca como yo, por haberme insistido tanto en romper la inercia y empezar a participar activamente para cambiar por lo menos algo. Por la 91, la 94 en el caribe y por la 97 y la 100 que están por venir. Gracias por esa locura capricorniana que compartimos junto con Caro. A Cari, por su buena onda conmigo siempre. Por sus consejos, por su ayuda con mi plan de posdoc. Porque sigamos trabajando juntos. A Lu y a Belu, por haber compartido esta última etapa de nervios y haberla atravesado juntos. A Mati, por los momentos de chimenea y las luchas compartidas, por la revolución. A Gabo, mi compañero de consejo, por los enojos y la bronca compartida, y por todos los lindos momentos. A Facu, Eli, Edu y Laura.

A toda la gente del INBIOMED, por haberme recibido tan cálidamente. Por elegir colaborar con nosotros y permitirme terminar muchos experimentos con ustedes. A Adriana, por la confianza y por creer en nuestras locas ideas. A Maru, Gabi, Sandra, Cami y Anto por sumarse a este amor por los baculo y por haber sido

siempre tan amables conmigo. A Mer, por toda la ayuda con los animales!

A Flor, gracias por tu amistad. Gracias por haber sido esa gran amiga desde que empezamos a cursar juntos. Por habernos podido dar el lujo de trabajar juntos! Por este broche de oro, como decís vos, para nuestras tesis. Te quiero mucho!

A mis amigos, a todos los amigos que la vida supo regalarme, que me acompañaron en todos los procesos y en este no fue la excepción. Nombrarlos a todos implicaría olvidarme de alguno pero sí quisiera agradecer especialmente a esos hermanos que la vida me dio: Belu, Bonso, Lucho, Eri, Yani, Leo, Sebas y Oges. Son lo más importante que tengo y no podría haber conseguido nada sin su apoyo y su amistad incondicional. A mi querida amiga Eli, que después de muchos años la vida nos volvió a juntar, sos muy importante para mí. A los chingoleros: Adri, Rober, Mai, Aye, Dani y Pablo. Gracias por estar siempre siempre en todos los momentos importantes de mi vida. Por muchísimas más aventuras juntos, México 2018 nos espera! A mis amigas desde que tengo memoria Laura, Belén y Sol, gracias por esa amistad tan linda que no conoce del transcurso del tiempo y se mantiene intacta para cada vez que podemos vernos. A Isa por todos los momentos compartidos juntos. A todos mis amigos de la facu, gracias por esa etapa maravillosa. A mi ahijado Agustín, por tener la posibilidad de acompañarte, verte crecer y ayudarte a conservar esa nobleza y la capacidad de asombro que te caracterizan. A mi padrino y compadre por permitirme meterle ideas “raras” en la cabeza a Agus (No te vas a salvar!!!).

A mi familia, que me acompaña siempre en todas las decisiones que tomo. Que me hizo la persona que soy y de la que me siento muy orgulloso. Gracias por ser mi sostén, por ser tan especiales para mí. Por inculcarme los valores que hoy me acompañan como adulto a todos lados.

A mis tíos Rosana y Ernesto, gracias por los maravillosos recuerdos de mi infancia, por todos los viajes a Uruguay, las charlas, los debates, las tardes de pesca, por Silvio. Gracias por estar siempre presentes sin importar la distancia. A mis primas Ailén y Anahí, gracias por quererme tanto, por hacerme sentir tan orgulloso con cada paso que dan. Porque las cosas que nos unen son muchísimo más fuertes que los kilómetros que nos separan.

A Hugo, Ana, Juli y Agus. Por estar siempre acompañándome, siempre atentos a cada paso que doy. Gracias por todos los viajes, por los momentos vividos y por todos esos fines de año divertidísimos que pasamos juntos. A Martín, Nachi,

Bianqui, Pablo, Luciana, Marti y Sofi por estar siempre conmigo.

A mis tíos Marga y Juan, gracias por estar siempre a mi lado en cada momento. Los quiero mucho. A mi tía Vilma, la tía más loca y linda que tengo. Gracias por hacerme reír tanto, por ser tan buena y tan importante para mí. A mis primos Ale, Gusti, Javi y Juan. Gracias por todos los momentos vividos en el campo, por estar siempre dispuestos a ayudarme a mí, o a mis viejos y mis abuelos. Por tantas tardes y noches de pesca, por los asados, las guitarreadas, los karaokes. Gracias por esas Navidades hermosas. Gracias a Santi, Eze, Cami, Mica, Mía, Fer, Gabi, Marti y Juli. A Inés, Andre, Gime y Silvia.

A mi tío Carlitos, gracias infinitas por el folklore, por Belgrano, por ser ese tío loco y lindo. A mi tía Zule, gracias por tu ternura, por acompañarme siempre. A mis abuelos Ana y Roberto, sé que hoy estarían muy orgullosos de este logro.

A mis abuelos Mabel y Horacio, por ser las personas más especiales de mi vida. Por disfrutar conmigo cada paso, cada esfuerzo, cada logro. Por las tortas y los limones a veces tan necesarios. Los amo!

A mis padres Luis y Patricia, por ser lo mejor que tengo en la vida. Por haberme acompañado siempre incondicionalmente, por ser mis pilares y las personas a las que siempre me querré parecer. Los amo viejos, esta tesis es para ustedes.

Gracias a toda la gente maravillosa que me acompaña día a día, porque “la felicidad sólo es real cuando es compartida” C.Mc.C.

Resumen

Los baculovirus son virus envueltos cuyo genoma consiste en una molécula de DNA doble hebra de entre 80 kpb hasta 180kpb. Los baculovirus han sido ampliamente utilizados con fines biotecnológicos. Una de sus aplicaciones más difundidas consiste en su uso como bioinsecticidas para el control biológico de plagas de insecto. Además, el baculovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) ha sido ampliamente utilizado como vector para la expresión de proteínas heterólogas en cultivo celular de insecto. Adicionalmente, se ha demostrado que los baculovirus poseen una significativa capacidad adyuvante cuando son utilizados para inocular diferentes mamíferos, así como la capacidad de transducir células de mamífero induciendo la expresión de genes heterólogos.

Este trabajo de tesis doctoral se centra en la utilización de los baculovirus como vectores de expresión de proteínas heterólogas, como vectores de inmunización mediante la expresión superficial de antígenos de interés y como vectores de transducción de genes para su utilización en estrategias de terapia génica.

En primer lugar, se utilizó la plataforma de expresión de proteínas recombinantes en células de insecto mediada por AcMNPV para expresar la proteína GPC del virus Junín (JUNV), agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina. Las glicoproteínas de superficie derivadas de GPC son responsables de la interacción de la partícula viral con la célula hospedadora y de mediar el ingreso a la misma. Por tal motivo, el desarrollo de alternativas vacunales seguras que apunten a generar inmunidad específica contra dicha proteína resulta de gran interés. En ese contexto, se generó un baculovirus recombinante capaz de expresar en cultivo celular de insecto la proteína GPC (Ac-GPC) incorporando las glicosilaciones correctas, pero con procesamiento incompleto. El péptido señal de GPC, SSP, fue reconocido en el sistema de expresión de células de insecto, direccionando la glicoproteína a la membrana plasmática celular.

Las células infectadas con el baculovirus Ac-GPC permitieron detectar la presencia de anticuerpos específicos para JUNV en plasma o suero de pacientes de FHA usando formatos de inmunofluorescencia indirecta o de ELISA.

Además, Ac-GPC resultó inmunogénico: al inocular ratones BALB/c con viriones brotantes (BV) pudo observarse la generación de anticuerpos específicos contra JUNV.

En segundo lugar, con el objetivo de desarrollar una plataforma para la exposición superficial de antígenos, se generó un sistema que permite obtener baculovirus recombinantes que exponen versiones de la proteína GP64 fusionada a polipéptidos heterólogos.

La estrategia de baculovirus *display* apunta a la obtención de memoria inmunológica dependiente de baculovirus y se basa principalmente en la exposición de uno o más epítopes de interés en la forma de un polipéptido quimérico fusionado a la proteína transmembrana mayoritaria de los viriones brotantes, GP64. Con algunas modificaciones esta estrategia permite expresar los genes seleccionados en células de mamíferos utilizando a los baculovirus recombinantes (recBV) como vehículos de transducción, permitiendo la generación de una respuesta celular específica, además de humoral. De allí nuestro interés en desarrollar un sistema de este tipo para el abordaje de la prevención de la fiebre hemorrágica argentina.

Para comprobar el funcionamiento de los vectores desarrollados tomamos como objeto de estudio la glicoproteína de superficie G1 de JUNV. Así, se generaron dos baculovirus recombinantes con la capacidad de expresar diferentes porciones de la proteína G1 de JUNV en fusión con GP64.

Se identificó, por métodos bioinformáticos, un péptido que sería responsable de la interacción de la proteína G1 de JUNV con su receptor celular. La utilización de los BV de los recBV Ac-G1Dis y Ac-G1PD en ensayos *in vivo* reveló que ambos virus inducen la generación de anticuerpos específicos contra JUNV. Paralelamente, se desarrollaron vectores que permitieron la generación de baculovirus con capacidad transductora en células de mamífero. Esto fue evaluado con el baculovirus Ac-ie1GPC y su capacidad transductora se evidenció por *Western Blot* y citometría de flujo.

En ensayos *in vivo* inoculando ratones BALB/c con Ac-ie1GPC pudo observarse la generación de inmunidad celular específica contra JUNV. Cultivos de esplenocitos provenientes de ratones inoculados con dicho baculovirus y pre-estimulados con JUNV inactivado mostraron actividad citotóxica específica al inducir mayores niveles de apoptosis en cultivos celulares con expresión superficial de la proteína GPC.

En función de los resultados alentadores obtenidos, se planea completar el estudio con la inoculación de los virus recombinantes Ac-GPC, Ac-G1Dis, Ac-

G1PD y Ac-*ie1GPC* en modelos animales adecuados y el posterior desafío con el agente etiológico. En base a estos estudios se diseñará el desarrollo y evaluación de una alternativa a la vacuna que se suministra actualmente, pudiendo alcanzar de ese modo a poblaciones de riesgo que en la actualidad no pueden ser inmunizadas con una vacuna a virus vivos atenuados.

Finalmente, en este trabajo exploramos la capacidad de los baculovirus de transducir células de mamífero a través de su utilización como vector de terapia génica. Para abordar este objetivo tomamos como objeto de estudio al péptido pequeño humanina (HN) y su rol en la citoprotección de células tumorales adenohipofisarias. Se diseñó un RNA de interferencia específico de HN y de su análogo en rata HNr capaz de regular negativamente la expresión de la misma y de revertir su efecto anti-apoptótico en células tumorales GH3. Se realizaron ensayos de expresión transitoria empleando un vector plasmídico y se observó que el shRNA fue funcionalmente activo.

Posteriormente, se obtuvo un recBV denominado Ac-shHN capaz de vehiculizar el shRNA y al utilizarlo para la transducción de las células GH3 se confirmaron los resultados previamente obtenidos con transfección plasmídica y se observó que la eficiencia de transducción superó notablemente a la eficiencia de transfección.

Ac-shHN fue capaz de inducir niveles de apoptosis en células GH3 hasta 3 veces superiores en relación a un baculovirus control.

Finalmente, los resultados obtenidos en ensayos *in vivo* mostraron que la inhibición de la HNr endógena tuvo un efecto significativo en la progresión de los tumores pituitarios.

Estos resultados podrían ayudar a diseñar terapias que utilicen HN como un blanco potencial para el tratamiento alternativo de tumores hipofisarios y de otros tipos tumorales empleando al baculovirus AcMNPV como vector para terapia génica.

En conclusión, el baculovirus AcMNPV fue utilizado de forma exitosa en diferentes aplicaciones relacionadas con la salud humana y constituye una herramienta poderosa para la expresión de proteínas heterólogas, para el *delivery* de antígenos y de genes tanto para la prevención como para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades.

Índice

Abreviaturas	17
Neologismos y términos en inglés	19
Capítulo I: Introducción General	21
Baculovirus	23
Biología de los baculovirus	23
Regulación temporal de la expresión génica	29
Baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas heterólogas	32
Proteínas de fusión baculovirales	33
GP64: Función y estructura.	34
Utilización de GP64 para el display de proteínas.	35
Baculovirus como inmunógenos.	36
Baculovirus surface display	39
Proteínas quiméricas que conservan la proteína GP64 completa	40
Inserción de péptidos dentro de GP64.	41
Partículas pseudo-virales	41
Baculovirus como vectores de transducción de células de mamífero	42
Baculovirus y la respuesta inmune celular	43
Otras Aplicaciones	44
Objetivo general	45
Objetivos específicos	45
Capítulo II: Expresión de GPC de JUNV en AcMNPV.	47
Introducción	49
Objetivos específicos	57
Materiales y métodos	58
Resultados	63
Discusión	75
Capítulo III: Baculovirus display y transducción de genes contra la FHA	79
Introducción	81
Objetivos específicos	84

Materiales y métodos	85
Resultados	91
Discusión	102
Capítulo IV: Baculovirus como vector de terapia génica contra tumores pituitarios.....	105
Introducción.....	107
Objetivos específicos del capítulo	113
Materiales y métodos	114
Resultados	119
Discusión	127
Capítulo V: Conclusiones Generales y Perspectivas.....	129
Conclusiones	131
Perspectivas.....	134
Capítulo VI: Materiales y métodos generales.....	135
Materiales	137
Métodos	140
Referencias.....	153

Abreviaturas

AAV: virus adeno asociados (del inglés *adeno associated virus*)
AcMNPV: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus
APC: células presentadoras de antígeno (del inglés *antigen presenting cells*)
BSA: seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)
BV: viriones brotantes o brotados (del inglés *budded virus*)
cDNA: DNA complementario
CTD: dominio carboxilo terminal
CpG: islas CpG (en esta tesis: patrón de metilación del DNA de baculovirus)
DC: células dendríticas (del inglés *dendritic cells*)
DIG: digoxigenina
DNA: ácido desoxirribonucleico (ADN)
dnapol: gen que codifica para la DNA polimerasa
dsDNA: DNA de doble cadena (*double stranded DNA*)
dsRNA: RNA de doble cadena (*double stranded RNA*)
ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
F: dominio fusogénico
FHA: fiebre hemorrágica argentina
FITC: Isotiocianato de fluoresceína (del inglés *fluorescein isothiocyanate*)
gra: granulina
GTOV: virus Guanarito
GV: granulovirus
HN: humanina
HNr: ratina
hr: región homóloga (*homologous region*)
HRP: peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*)
hs: horas
hTfR1: receptor 1 de la transferrina humana (*human Transferrin Receptor 1*)
IF: inmunofluorescencia
IFN: interferón
IFN- γ : interferón γ
IL: interleuquina
INEVH: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (Pergamino, provincia de Buenos Aires)
INBIOMED: Instituto de Investigaciones Biomédicas (Facultad de Medicina, UBA; CONICET; Buenos Aires)
JEV: virus de la encefalitis japonesa (*Japanese encephalitis virus*)
JUNV: virus Junín
kpb: kilopares de bases (1000 pb)
mAb: anticuerpo monoclonal
MACV: virus Machupo
MMD: dominio de multimerización (*multimerization domain*)
MNPV: *Multiple Nucleopolyhedrovirus*
MW: marcador de peso molecular (del inglés *molecular weight*)
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)
min: minutos
MOI: multiplicidad de infección (del inglés *multiplicity of infection*)
miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensajero
NC: nucleocápside
no-*hr*: región no homóloga
NPV: *Nucleopolyhedrovirus*
NK: *natural killer*
NW: Nuevo Mundo (del inglés *New World*)
OB: cuerpo de oclusión (del inglés *occlusion body*)
ODV: viriones derivados de oclusión (del inglés *occlusion-derived virus*)
ON: toda la noche (del inglés *over night*) usado para tiempos de 12-16 hs
OPD: o-fenilendiamina (*o-phenylenediamine*)
ORF: marco abierto de lectura (del inglés *open reading frame*)
ori: origen de replicación
OW: Viejo Mundo (del inglés *Old World*)
pb: pares de bases
PBS: buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffer saline*)
PBST: PBS con Tween 0,1% (v/v)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
PE: ficoeritrina (*phycoerythrin*)
PFU: unidades formadoras de placa (del inglés, *plaque forming units*)
polh: poliedrina (*polyhedrin*)
recBV: baculovirus recombinante
RNA: ácido ribonucleico (ARN)
RNAi: RNA de interferencia
rRNA: RNA ribosómico
rpm: revoluciones por minuto
RT: transcripción inversa o transcriptasa reversa, dependiendo del contexto (*reverse transcriptase*)
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante.
shRNA: del inglés *short hairpin RNA*
SNPV: *Single Nucleopolyhedrovirus*
SP: péptido señal (del inglés *signal peptide*)
SSP: péptido señal estable (del inglés *stable signal peptide*)
TA: temperatura ambiente
TfR1: receptor 1 de la transferrina
TfR2: receptor 2 de la transferrina
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (en inglés: *transforming growth factor β*)
TLRs: receptores tipo *Toll* (del inglés *Toll like receptors*)
TM: dominio transmembrana
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: *tumor necrosis factor α*)
TUNEL: Determinación microscópica de la fragmentación del DNA por incorporación enzimática de dUTP con transferasa terminal en los extremos 3' (del inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)
UV: ultravioleta
VSV: virus de la estomatitis vesicular (*vesicular stomatitis virus*)
WB: *western blot*
wt: del inglés *wild type*

Neologismos y términos en inglés

background: falsos positivos. Cantidad de clones o moléculas no recombinantes que dificultan la identificación de aquellos positivos.

cassette: fragmento de DNA doble cadena que, generalmente, contiene genes y otras secuencias destinadas a ser incorporadas en bloque por recombinación homóloga a otro DNA

coating: revestimiento del soporte sólido para ELISA con una proteína o complejos de macromoléculas capaces de unirse con anticuerpos u otras macromoléculas

delivery: entrega de una macromolécula o fármaco en una célula o tejido mediante un vehículo

surface display: exposición superficial

screening: búsqueda de clones positivos

downstream: "corriente abajo" en una secuencia de DNA (hacia el costado 3')

feedback: retroalimentación

ladder: conjunto de marcadores de tamaños moleculares ("escalera" de tamaños)

pseudotyping: modificación de un virus con la proteína de superficie de otro o con una proteína recombinante (este tipo de modificación es el más habitual, aunque no es el único)

primer: oligonucleótido iniciador o cebador de DNA cadena simple utilizado para PCR

upstream: "corriente arriba" en una secuencia de DNA (hacia el costado 5')

Capítulo I

Introducción general

Baculovirus

Biología de los baculovirus

Los baculovirus comprenden una familia de virus específicos de artrópodos. Han sido aislados a partir de unas 600 especies diferentes de insectos, pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera, Coleoptera, Neuroptera, Thysanura and Trichoptera [1, 2]. A pesar de eso, hasta el momento sólo se encuentran aceptadas oficialmente especies de baculovirus que infectan artrópodos de los órdenes Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera y de éstas, la gran mayoría de ellas han sido aisladas de lepidópteros. Hasta el momento, no se ha observado la infección de baculovirus en ningún vertebrado, por lo cual su aplicación y manipulación se considera segura para el hombre. El genoma de estos virus, que varía entre los 80 y 180 kpb, se encuentra en forma de DNA circular de doble cadena y empaquetado en una nucleocápside con forma de bastón con un tamaño de entre 40 y 50 nm de diámetro y entre 200 y 400 nm de longitud. Las nucleocápsides se encuentran envueltas en una membrana lipoproteica.

Entre las estrategias desarrolladas por los virus para mantener un reservorio genético que permita la subsistencia de la especie, las más difundidas consisten en permanecer en estado de latencia dentro del hospedador e infectar una especie hospedadora alternativa. Sin embargo, estas estrategias no resultan adecuadas para los baculovirus, debido al limitado tiempo de vida del huésped, su población estacional y cíclica y a los profundos cambios fisiológicos que tienen lugar en el ciclo de vida del insecto.

A lo largo de la evolución, los baculovirus han desarrollado la capacidad de ocluir sus viriones en cristales proteicos, conformando cuerpos de oclusión (OB: *occlusion bodies*). Esta adaptación les permite permanecer en estado de latencia en el ambiente conservando su viabilidad durante un tiempo prolongado. De esta manera, los baculovirus pueden soportar condiciones ambientales adversas como por ejemplo desecación, radiación ultravioleta, etc.

En los comienzos del estudio de la familia Baculoviridae estos se agruparon, en base a la morfología de los OB, en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV). Ambos presentan cuerpos de oclusión característicos, visibles al microscopio óptico. Los OB de los NPV resultan fácilmente

distinguibles, debido que presentan una estructura poliédrica más grande y refringente (0.8-2 μm). Los OB de los GV aparecen como gránulos ovoides oscuros que son más difíciles de distinguir debido a su menor tamaño ($\sim 0.5 \mu\text{m}$). Debido a ello los OB de los NPV se conocen como poliedros y los de los GV se denominan gránulos. En correspondencia con esta denominación, la proteína principal que compone los OB de los NPV se llama poliedrina y la que compone los OB de los GV, granulina. En cada OB de un NPV se ocluyen muchos viriones. En cambio, en el OB de un GV se ocluye un único virión. A su vez, en los NPV, cada virión puede contener varias o una única nucleocápside envuelta en una membrana lipoproteica, distinguiéndose de esta forma los NPV múltiples (MNPV) y simples (SNPV)[3] (Figura I.1).

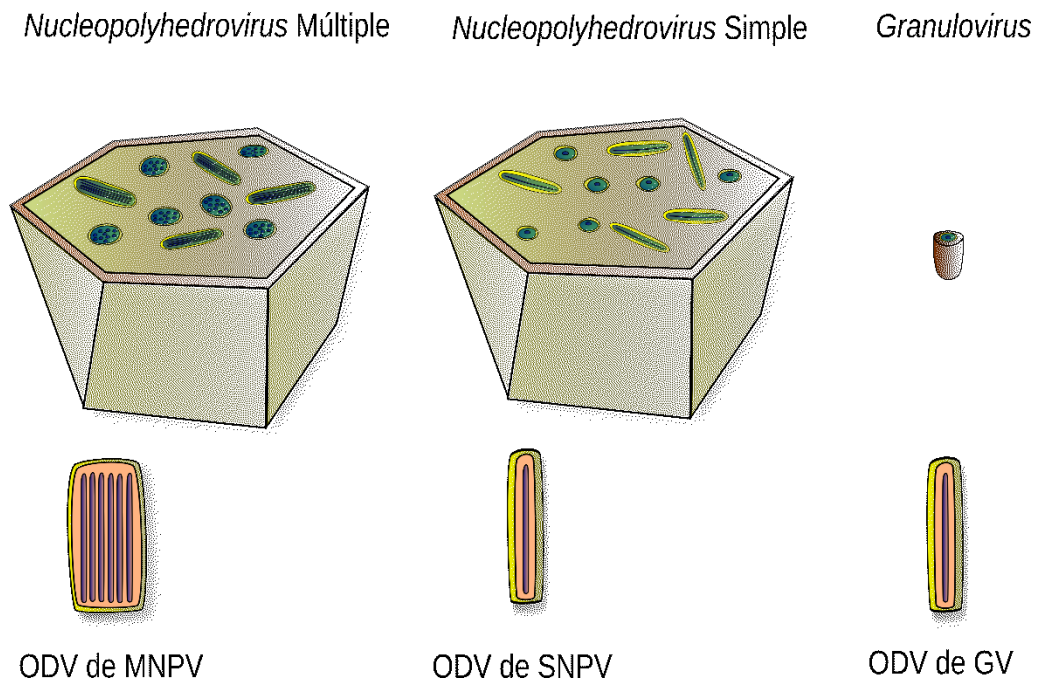


Figura I. 1 Esquemas de los tres principales tipos de viriones de ODV. Los OB de GV tienen forma granular y contienen un único virión, en tanto que los OB de NPV, mucho más grandes que los primeros, son poliedros que contienen múltiples ODV. Los NPV se dividen, a su vez, en NPV múltiples y simples, de acuerdo al número de nucleocápsides encontradas en cada ODV. Adaptado de Haase, 2013 [3].

La información aportada por la creciente cantidad de genomas de baculovirus secuenciados condujo a la reformulación de la clasificación taxonómica de los baculovirus [4-6] (Figura I.2), en la cual se discriminan cuatro géneros de acuerdo al hospedador: *Alphabaculovirus* (NPV específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específicos de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPV específicos de dípteros).

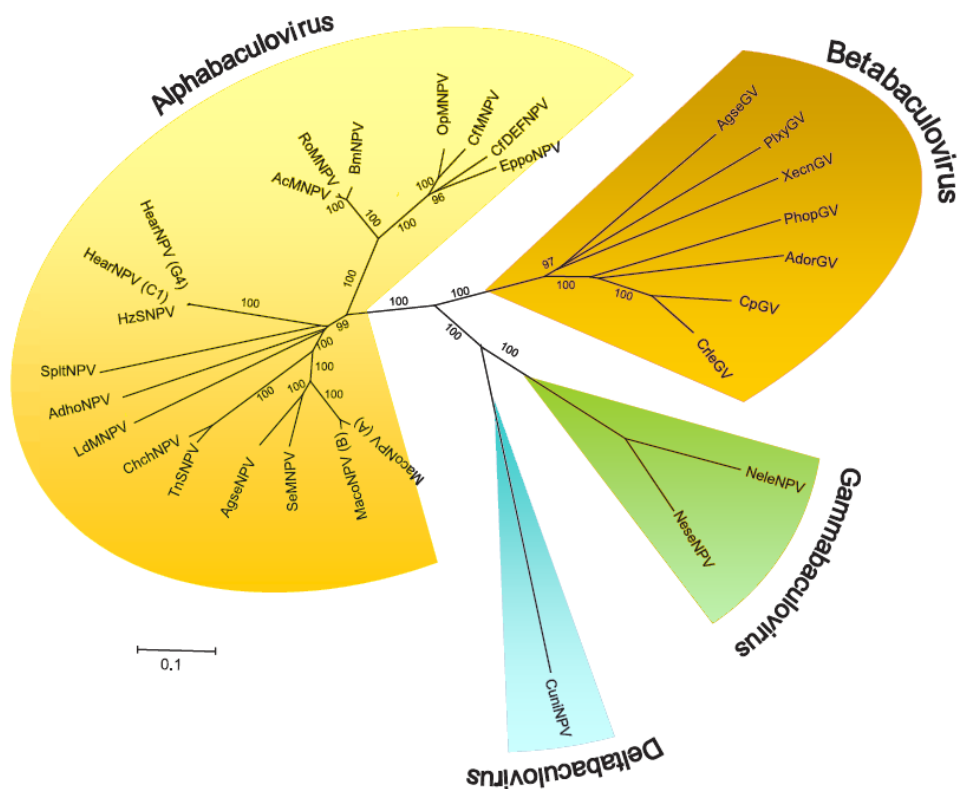


Figura I. 2 Esquema de la nueva clasificación taxonómica de la familia Baculoviridae. Adaptado de Jehle et al., 2006 [4].

Dentro del género de los *Alphabaculovirus*, *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus es el más estudiado y utilizado en biotecnología. El ciclo de infección comienza cuando una larva susceptible ingiere material foliar contaminado con los OB. Los OB se desintegran al alcanzar el intestino medio de la larva debido al pH alcalino liberando al primer fenotipo viral: los viriones deivados de cuerpos de oclusión (ODV: *Occlusion Derived Virus*) Los ODV inician la infección primaria en las células epiteliales del intestino medio de la larva (Figura I.3).

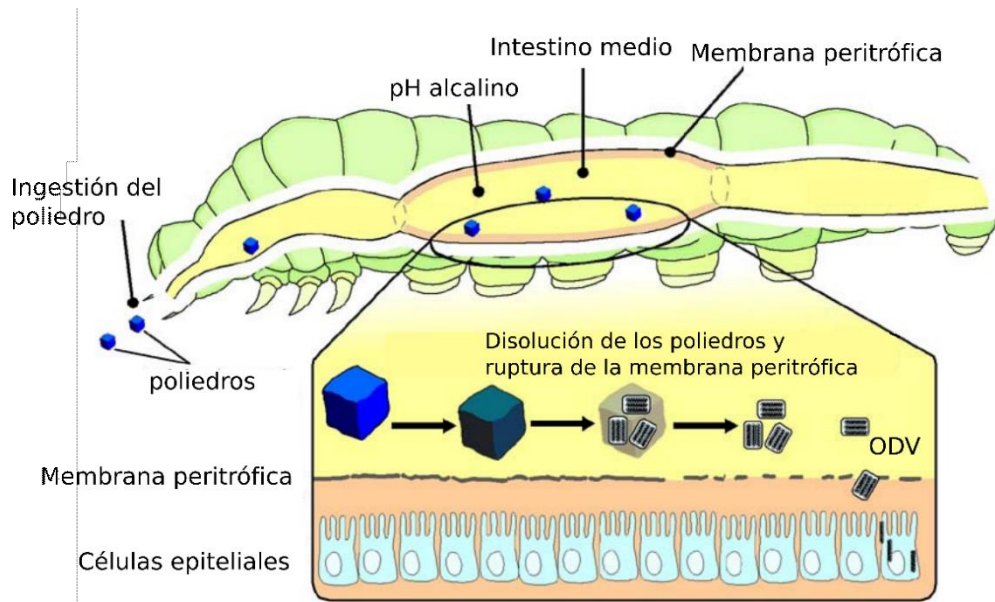


Figura I. 3 Representación de una larva de lepidóptero. Un cuerpo de oclusión (OB) presente en el ambiente es ingerido por la larva comenzando un nuevo ciclo de infección. Cuando el OB alcanza el intestino medio se disuelve en el medio alcalino, liberando los ODV. La membrana peritrófica, que protege a las células epiteliales del contacto directo con el contenido intestinal, es degradada por la acción de proteínas presentes en el OB permitiendo el ingreso de los ODV en las células epiteliales (adaptado de Rohrmann 2013 [2]).

La progenie viral de la infección primaria consiste en los viriones brotados (BV: *Budded Virus*) que llevan adelante la infección secundaria o sistémica de la larva (Figura I.4). Estos fenotipos virales se diferencian en sus eficiencias de infección en los diferentes tipos celulares. Los ODV infectan células del intestino medio con una eficiencia 10 mil veces mayor que los BV; mientras que estos últimos infectan cultivos celulares con una eficiencia de más de mil veces.

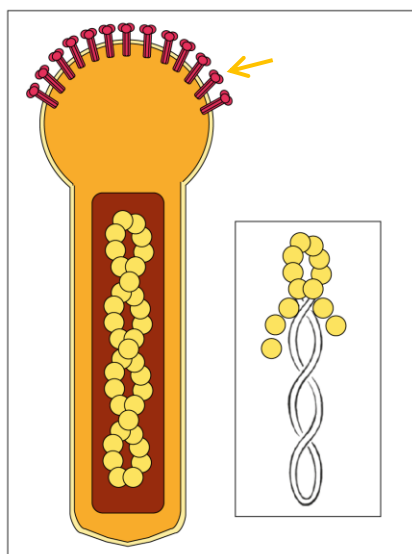


Figura I. 4 Estructura del virión brotante (BV) de AcMNPV. La flecha amarilla indica la distribución de la proteína mayoritaria del BV, GP64.

El ingreso de los BV de AcMNPV a la célula hospedadora es mediado por una glicoproteína viral de clase III en la superficie del virión denominada GP64 que interacciona con un receptor celular poco caracterizado. Esta interacción desencadena la vía de internalización endosómica dependiente de clatrina y la subsecuente acidificación de la vesícula internalizada. Dicha variación en el pH genera un cambio conformacional en la proteína viral GP64 que acerca tanto la membrana del virión como la membrana vesicular dando como resultado la fusión de ambas. De este modo, la nucleocápside viral es liberada al citoplasma y migra al núcleo celular donde el DNA resulta accesible permitiendo el inicio de la cascada transcripcional (Figura I.5).

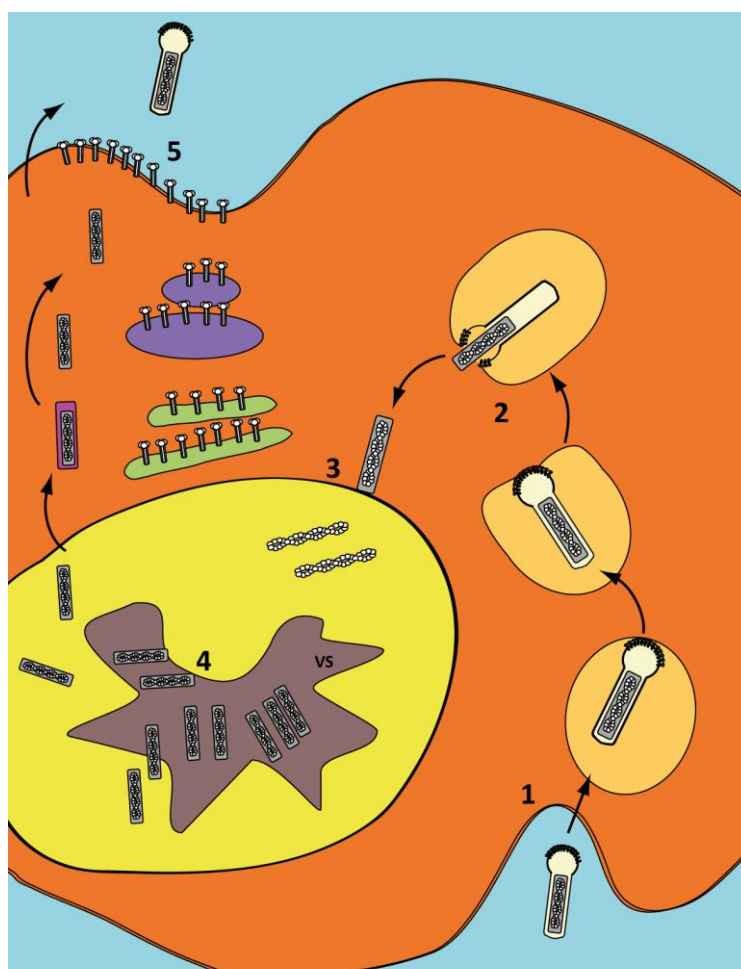


Figura I. 5 El ciclo de infección en las células somáticas de la larva (excepto en células del intestino medio) comienza cuando un virión brotante interacciona con la superficie celular y es endocitado (1). Cuando la vesícula endocítica se acidifica, la proteína de fusión GP64 media la fusión de la membrana plasmática y la envoltura viral liberando la nucleocápside en el citoplasma (2). La nucleocápside es entonces transportada al núcleo (3) donde es desensamblada y el DNA viral puede ser transcrito y replicado en el estroma virogénico (4). Allí nuevas nucleocápsides son ensambladas, egresan del núcleo y son transportadas hacia la membrana plasmática donde brotan adquiriendo su envoltura conteniendo la glicoproteína GP64 (5).

El genoma de AcMNPV codifica para más de 150 genes que se transcriben de forma coordinada. En primer lugar, la RNA polimerasa II celular transcribe los genes inmediatos tempranos que codifican generalmente para factores de transcripción, como IE1, y controlan la transcripción subsiguiente de otros genes e incrementan la propia. A continuación el DNA es replicado y el ciclo ingresa en un período de transición en la que el DNA se encuentra relajado y los promotores tardíos expuestos para la transcripción .

Los baculovirus codifican en su genoma una RNA polimerasa que transcribe los genes tardíos y muy tardíos reconociendo la secuencia promotora viral consenso que incluye los nucleótidos DTAAG (donde D representa A, T o G).

Durante la infección sistémica, las nucleocápsides son ensambladas en el estroma virogénico. Las proteínas de la envoltura son traducidas en asociación con el retículo endoplásmico, glicosiladas y transportadas e incorporadas a la membrana plasmática (vía secretoria). Las nucleocápsides destinadas a convertirse en BV dejan el núcleo y son transportadas hacia la membrana plasmática donde las proteínas de la envoltura (GP64 y proteína F) se concentran y finalmente brotan obteniendo de ese modo sus envolturas [7] (Figura I.5).

De este modo, en primer lugar, son producidos los BV y se desarrolla la infección sistémica de todo el insecto. Finalmente, en momentos más tardíos de la infección se producen los viriones ocluidos en el núcleo, que se carga de OB y, finalmente, éstos se liberan al ambiente al desintegrarse las células (en muchos casos se observa la licuación de la larva).

Los baculovirus han resultado ser herramientas biotecnológicas muy útiles para el campo de la agricultura, así como para la salud humana y veterinaria. Una de las aplicaciones más comunes consiste en su utilización como agentes para el control biológico de plagas de insectos. Si bien se ha invertido mucho trabajo en el desarrollo de pesticidas basados en baculovirus, el uso comercial de los mismos ha sido limitado. Esto se debe principalmente a la baja velocidad con que los virus son capaces de matar al insecto y su limitado rango de hospedador. Actualmente muchos grupos de investigación se encuentran trabajando en superar estas limitantes y en desarrollar nuevas estrategias para el control biológico. Una de ellas consiste en la introducción de modificaciones en el genoma del baculovirus para la expresión de proteínas tóxicas para los insectos.

Regulación temporal de la expresión génica

La regulación temporal de la expresión de los genes virales ha sido estudiada principalmente en el baculovirus modelo AcMNPV. En este virus la expresión tiene lugar en forma de cascada, en la cual la expresión de los genes en una etapa determinada requiere la presencia de los productos génicos de etapas anteriores. La expresión génica durante el ciclo de infección por baculovirus puede ser dividida en cuatro fases temporales: fase temprana inmediata, temprana retrasada, tardía y muy tardía (Tabla I.1) [2].

Genes tempranos

Los genes tempranos pueden subdividirse en dos categorías: tempranos inmediatos y tempranos retrasados (genes α y β). Ambos son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula hospedante, sensible a la α -amanitina. Los genes α y β difieren en sus promotores y en las secuencias activadoras a distancia (*enhancers*). Los genes tempranos inmediatos son expresados dentro de los 30 min post-infección, una vez que las nucleocápsides han alcanzado el núcleo [8]. Los genes tempranos retrasados requieren de la unión de transactivadores virales (sintetizados previamente) a los *enhancers* para alcanzar niveles de expresión máximos. Los promotores de estos genes se asemejan a los promotores de genes del hospedante, tienen un motivo TATA *box* típico y un sitio de inicio de la transcripción caracterizado por la secuencia CAGT que se ubica 25-31 pb *downstream* del motivo TATA *box* y son reconocidos por extractos nucleares de células no infectadas [9]. La secuencia CAGT está involucrada en la eficiencia del inicio de transcripción, probablemente influyendo sobre la afinidad por el factor de transcripción TF II D [10-12].

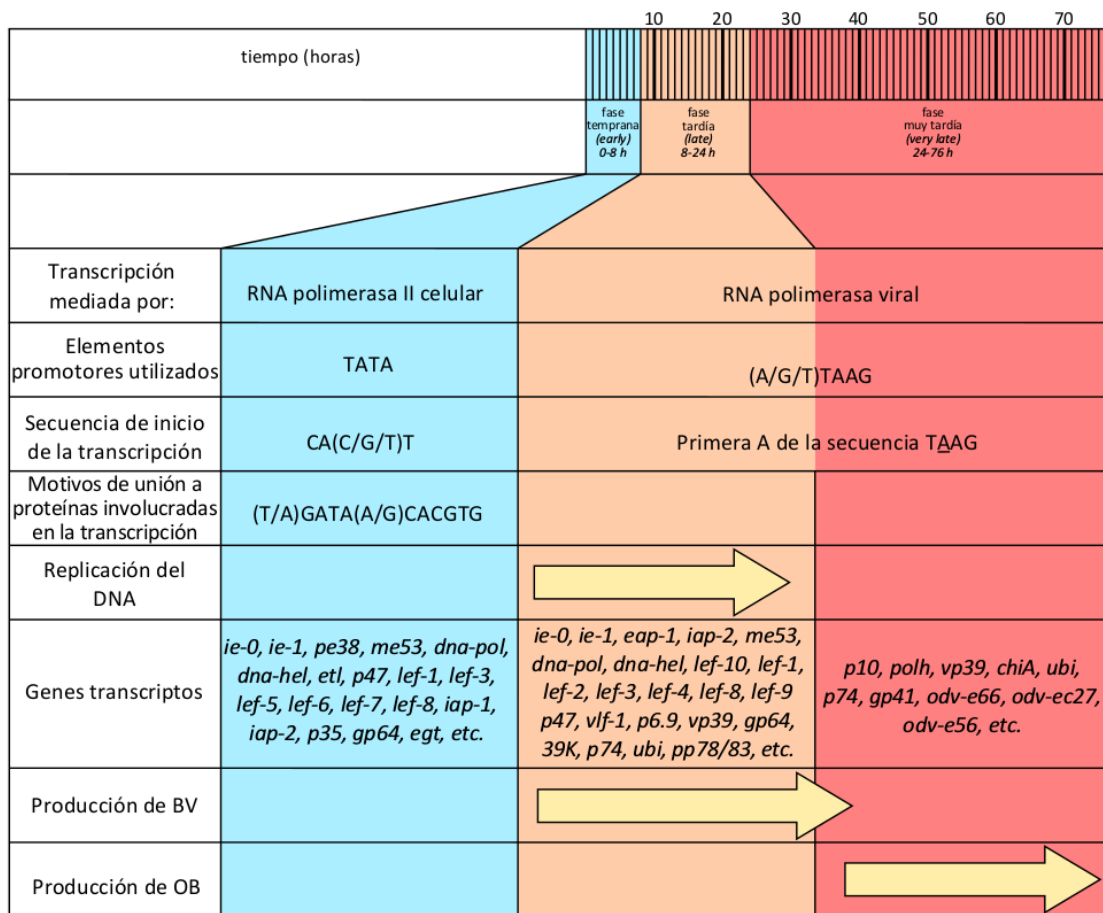


Tabla I. 1 Etapas en la infección con NPV. La expresión de los genes de los baculovirus ocurre en forma de cascada (factores codificados en una etapa son necesarios para el desarrollo en las etapas posteriores) y se divide en tres etapas: temprana, tardía y muy tardía. La transcripción de genes tempranos depende de la RNA polimerasa celular aunque, con la excepción de los genes inmediatos, requiere de factores adicionales codificados por el virus. La replicación del DNA es un requisito para la expresión de genes tardíos y muy tardíos, los cuales se transcriben utilizando la RNA polimerasa viral. (Adaptado de: Romanowski, V. y Ghiringhelli, P.D.: “Biología molecular de los baculovirus. Replicación y regulación de la expresión génica”, Capítulo V, En: “Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas” P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams, eds. [12])

Replicación

La replicación del DNA se produce en el núcleo de la célula infectada, una vez que se acumularon los productos génicos virales expresados durante la etapa temprana. Los elementos que actúan *in cis* requeridos para la replicación (origen de replicación u *ori*) han sido identificados por el análisis de genomas defectivos obtenidos luego de varios pasajes virales en cultivo de células de insecto [13, 14] y por ensayos de replicación transitorios [15, 16]. La actividad de *ori* fue

encontrada en los baculovirus por estar asociada con las “regiones homólogas” (*hr*, por *homologous region*) [17]. Las *hr* contienen secuencias palindrómicas interespaciadas con repeticiones directas cortas capaces de formar estructuras secundarias y se encuentran dispersas a lo largo del genoma del baculovirus. Estas secuencias también pueden actuar como *enhancers* transcripcionales. La presencia de las secuencias *hr* es una característica común de los baculovirus, aunque aún su función no se conoce en profundidad. Además de los *ori* tipo *hr*, se identificaron secuencias no-*hr* con actividad *ori* mediante ensayos de replicación transitoria en los genomas del nucleopoliedrovirus de *Orgyia pseudotsugata* [18], de *Autographa californica* [14], de *Spodoptera exigua* [19] y de *Spodoptera litura* [20]. Estos *ori* llamados de tipo no-*hr* carecen de las secuencias palindrómicas o repeticiones encontradas en los *ori* tipo *hr*. Los *ori* no-*hr* de diferentes baculovirus no tienen homología estructural entre ellos ni semejanza con los *ori* tipo *hr* en el mismo genoma. Sin embargo, poseen elementos básicos que se encuentran en el consenso de los *ori* eucariotas tales como múltiples repeticiones invertidas y directas, palíndromes y secuencias ricas en AT [21]. A diferencia de los *ori* tipo *hr*, la presencia y distribución de motivos de estructura secundaria dentro de las secuencias *ori* no-*hr* es probablemente más importante para la actividad *ori* que la secuencia nucleotídica en sí misma.

Los elementos que actúan en *trans* requeridos para la replicación del DNA viral incluyen, entre otros, la DNA polimerasa viral (*dnapol*), *p143* (helicasa), *lef-1* (DNA primasa) y *lef-2*, cuatro genes que han sido encontrados en todos los baculovirus secuenciados hasta el momento [22]. Se han identificado cinco genes esenciales (*p143*, *ie-1*, *lef-1*, *lef-2*, y *lef-3*) y cinco genes estimulantes de la replicación del DNA (*dnapol*, *p35*, *ie-2*, *lef-7*, y *pe38*) en AcMNPV [23]. En ensayos de replicación transitoria, los plásmidos que contienen *hr* replican a una alta tasa [15]. En otros estudios, un plásmido basado en pUC, sin ninguna secuencia *ori* viral, pudo replicarse en células de insecto infectadas formando concatémeros y/o integrándose en el genoma viral [24]. Estas observaciones apoyarían un mecanismo de replicación de DNA tipo círculo rodante, mientras Kool y colaboradores (1995) [25] sugieren una posible combinación de los mecanismos de círculo rodante y tipo *theta*. Oppenheimer y Volkman (1997) [26] fueron capaces de detectar múltiples fragmentos de genoma de una unidad de longitud en proceso de replicación, sugiriendo que AcMNPV replica en una

manera cabeza-cola vía un mecanismo de círculo rodante.

Genes tardíos y muy tardíos

Entre las 8 y 24 h. p. i. ocurre la transcripción y expresión de genes tardíos (o genes γ), la producción de proteínas estructurales y la formación de BV. Estos genes así como también los genes muy tardíos (o genes δ) tienen un sitio de inicio de la transcripción invariante y universal (A/G/T)TAAG y son transcritos por la RNA polimerasa codificada por el propio virus. Además, en estudios de expresión transitoria se demostró que dieciocho genes de AcMNPV son esenciales para lograr niveles de expresión óptimos de un gen indicador bajo el control de promotores tardíos y muy tardíos (entre ellos, *vp39*, *p6.9*, *polh* y *p10*) [17]. En la fase tardía se expresan, entre otros, los genes que codifican las proteínas estructurales dando comienzo a la etapa de ensamblaje de nucleocápsides (NC) en el núcleo de la célula infectada [25]. La expresión génica muy tardía comienza alrededor de las 18-24 hpi (horas post-infección) y se caracteriza por un dramático incremento de la transcripción y expresión de genes muy tardíos, y la reducción de la transcripción de genes tardíos. En los promotores muy tardíos, a diferencia de los tardíos, el nivel de expresión no depende del contexto inmediato en el que se encuentra la secuencia TAAG sino de una secuencia denominada *burst sequence* que se localiza entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de la traducción. En los promotores muy tardíos esta secuencia es rica en AT e influye en la actividad del promotor. Esta región interactúa con proteínas celulares, las cuales son imprescindibles para asegurar altos niveles de transcripción de genes tales como poliedrina (*polh*) o granulina (*gra*), *p10* y otros que codifican proteínas necesarias para formar los cuerpos de oclusión [27]. El producto del gen *p10* está asociado con la formación de extensas estructuras fibrilares en el núcleo y citoplasma de células infectadas [28]. También se ha sugerido que podría contribuir a la ruptura de la membrana nuclear y la liberación de los cuerpos de oclusión desde las células infectadas [29].

Baculovirus recombinantes para la expresión de proteínas heterólogas

Dado que *polh* y *p10* no son necesarias para la transmisión de baculovirus en cultivo celular y que se expresan en altos niveles durante la infección, sus promotores han sido utilizados para el desarrollo de vectores de expresión. La

región codificante de estos genes puede ser reemplazada por genes exógenos o heterólogos que resultan en la producción de altos niveles de proteína de interés [30, 31]. Se ha desarrollado una variedad de mejoras tecnológicas que simplificaron los procedimientos tediosos para generar y aislar los virus recombinantes y convirtieron al sistema de expresión basado en baculovirus en un método seguro y fácil de utilizar [32].

Además, los baculovirus han sido utilizados para el desarrollo de estrategias basadas en la exposición de péptidos y proteínas de interés en la superficie viral, así como para la transducción de células de mamífero utilizando diferentes *cassettes* de expresión. Estos tópicos serán desarrollados más adelante.

Proteínas de fusión baculovirales

Los virus envueltos requieren de proteínas específicas que medien la fusión de la membrana de su envoltura con la membrana plasmática de la célula hospedadora para poder ingresar. Si la fusión ocurre en la superficie de la célula, las proteínas de fusión virales suelen actuar a pH neutro. En cambio, si el ingreso ocurre por endocitosis mediada por receptor, las proteínas de fusión virales exhiben una máxima actividad luego de la acidificación de la vesícula endosómica [33].

Las proteínas de fusión de los baculovirus median la fusión de membranas en un estado endosómico tardío. Por esa razón, la máxima actividad fusogénica en proteínas de fusión de baculovirus es observada a valores de pH bajo.

Los baculovirus pueden ser clasificados en dos grupos diferentes de acuerdo a la glicoproteína de superficie que utilizan para mediar la fusión entre la membrana endosomal y la envoltura viral. Uno de los grupos se encuentra conformado por aquellos virus que utilizan la proteína GP64 como proteína de fusión mayoritaria, mientras que el otro grupo se compone de los virus que utilizan la proteína F. Esta división coincide con la separación de los NPV de lepidópteros en dos grupos mayores: Grupo I y grupo II. Estos grupos difieren significativamente en el contenido génico y los miembros del grupo I utilizan GP64 mientras que los virus que componen el grupo II no poseen el gen *gp64* y codifican para la proteína F [34].

AcMNPV es el baculovirus más estudiado y pertenece al Grupo I. Los BV de AcMNPV poseen en su envoltura la glicoproteína principal de superficie GP64.

Si bien la proteína F se encuentra también presente, se ha demostrado que no desarrolla ningún rol durante la infección.

GP64: Función y estructura.

Las proteínas de fusión virales pueden dividirse en tres clases. Las proteínas de clase I contienen péptidos de fusión hidrofóbicos en su extremo N-terminal, las de clase II poseen su péptido de fusión en *loops* internos, mientras que las proteínas de fusión de clase III poseen características diversas en lo que respecta a su estructura y a sus péptidos de fusión. La proteína de fusión de AcMNPV, GP64, pertenece a este último grupo.

Se ha demostrado que GP64 es capaz de mediar la fusión de membranas en condiciones de pH ácido tanto en viriones brotantes como cuando es expresada de forma recombinante en líneas celulares. Es una fosfoglicoproteína acilada con un ácido graso cerca de su único dominio transmembrana [33]. El marco de lectura abierto (ORF) *gp64* de AcMNPV codifica para un polipéptido de 512 aminoácidos con 15 residuos de cisteína que participan en la formación de puentes disulfuro necesarios para la conformación de la estructura nativa.

Se pueden distinguir cinco dominios presentes en GP64 que forman una estructura macromolecular muy diferente a la mayoría de las proteínas de fusión virales descritas, aunque GP64 conserva las características generales de una típica proteína de fusión viral. Estas características incluyen: 1) un dominio de fusión capaz de mediar la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral. 2) un dominio transmembrana (TM) que ancla la proteína a la bicapa lipídica y 3) un dominio de multimerización (MMD) que le permite a la proteína formar trímeros. La estructura detallada de GP64 se muestra en la Figura I.6. GP64 contiene además un dominio de 7 aminoácidos denominado cola citoplasmática (CTD) en su extremo C-terminal que se encontraría involucrado en la brotación del virus (Figura I.6)

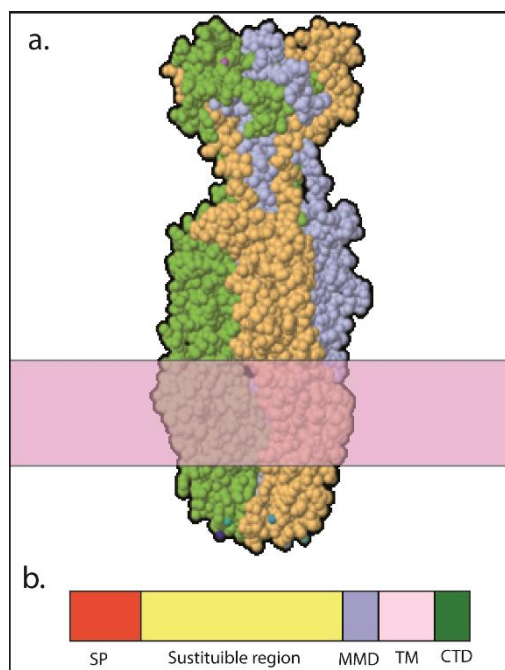


Figura I. 6 *a. Estructura trimérica de la glicoproteína mayor de superficie de los BV GP64 obtenida utilizando la herramienta Make multimer del servidor online Expasy en www.expasy.org. b. Esquema del polipéptido GP64 mostrando los diferentes dominios funcionales relevantes para la exposición superficial de antígenos: el péptido señal (SP) que es eliminado en la vía secretoria, una región sustituible por otros polipéptidos, el dominio de multimerización (MMD), el dominio transmembrana (TM) y el dominio carboxilo terminal (CTD).*

Los viriones brotantes ingresan a la célula hospedadora mediante endocitosis mediada por receptor. GP64 induce la fusión con la membrana endosómica a pH bajo. Además, GP64 se diferencia de otras proteínas de fusión en que los cambios conformacionales que experimenta durante la fusión de las membranas son reversibles [7, 35].

Utilización de GP64 para el *display* de proteínas.

La expresión de *gp64* se encuentra bajo el control de un promotor temprano pero que en el contexto de la infección viral es regulado para tener su máxima actividad en etapas tardías. Es una proteína de 64 kDa que forma trímeros y se localiza en la envoltura de los BV con una distribución polarizada (Figura I.4). Dado que se trata de una glicoproteína de superficie que expone por fuera del virión un dominio exterior relativamente grande, es un buen candidato para realizar *display* superficial de péptidos de interés. De este modo puede construirse una proteína GP64 quimérica con secuencias de la proteína de

interés que puede ser incorporada en la superficie de los BV durante la infección de células de insecto [36]. Sin embargo, es necesario conservar una copia intacta de GP64 *wild type* para mantener la infectividad de los viriones. Se ha informado que no es necesario conservar la estructura completa de GP64 para la construcción de proteínas quiméricas. El péptido señal (SP), el dominio de multimerización, el dominio transmembrana (TM) y el dominio citoplasmático (CTD) son suficientes para lograr la exposición de proteínas heterólogas en la superficie de los viriones brotantes (Figura I.6).

Baculovirus como inmunógenos.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa de un organismo ante la infección de un patógeno. Una de las funciones fundamentales de la misma reside en montar una respuesta fuerte y específica expresando factores co-estimulatorios necesarios para la activación de los tipos celulares intervinientes en la respuesta inmune adaptativa. Por ello, un buen inmunógeno será aquel capaz de generar una fuerte respuesta innata que conduzca a una activación adecuada de la inmunidad adaptativa con la consecuente generación de memoria inmunológica [37].

En diferentes trabajos se ha demostrado que los baculovirus son capaces de transducir líneas celulares de macrófagos e inducir la secreción de diferentes citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 12 (IL-12), entre otras [38-41].

AcMNPV es capaz de activar ciertas poblaciones de células de la inmunidad innata y de inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias cuando es inoculado en mamíferos a través de la vía de señalización dependiente de MyD88/TLR9. TLR9 pertenece a la familia de los receptores transmembrana tipo *toll* que reconocen y se unen a diferentes ligandos tanto endógenos como exógenos. La vía de señalización a través de este tipo de receptores usualmente culmina habitualmente en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la consiguiente modulación de la respuesta inmune innata [39, 41].

El receptor TLR9 es capaz de estimular *in vivo* el sistema inmune a través del reconocimiento de oligodesoxinucleótidos que contienen motivos no metilados CpG. Al igual que el DNA bacteriano, el genoma de AcMNPV contiene un número significativo de motivos CpG con potencial bioactivo. De hecho, existen estudios

en los que se demostró que AcMNPV es capaz de estimular células presentadoras de antígeno profesionales (APC: *Antigen Presenting Cells*) a través de esta vía de señalización y que es necesaria la fusión de membranas mediada por GP64 y la liberación del genoma viral dentro de pequeñas vesículas conteniendo TLR9 para que dicha vía se active [42-44] (Figura 1.7.a).

Si bien los baculovirus no pueden replicar de manera exitosa en células de mamífero o de otros vertebrados, se ha demostrado recientemente que poseen propiedades adyuvantes muy poderosas en ratón, promoviendo la generación de una respuesta humoral potente así como una respuesta adaptativa celular T CD8+ [42, 45]. Por otra parte, también se observó la maduración *in vivo* de células dendríticas y la consecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias (Figura 1.7.c). Chimeno Zoth y colaboradores evaluaron el efecto de la administración de baculovirus sobre la inmunidad innata de pollos, encontrando una sobre-expresión de IFN- γ e IL-6 en muestras de bazo correspondientes a los pollos tratados con baculovirus, así como una disminución en la expresión de TGF- β . Estos resultados indican que los baculovirus son capaces de inducir una fuerte respuesta pro-inflamatoria [40].

Por otra parte, se ha observado que la respuesta inducida por la inoculación de BV es muy limitada. Esto es en sí mismo un beneficio interesante ya que los baculovirus son capaces de estimular fuertemente el sistema inmune innato pero por un tiempo corto, eliminando potenciales daños producidos por una respuesta inflamatoria sostenida [40]. Además, Kitajima y colaboradores demostraron que la inoculación de ratones con AcMNPV es capaz de inducir la activación de células *Natural Killer* (NK); observándose un incremento de cuatro veces en el número de células NK en ratones tratados en relación a los ratones no tratados en bazo, hígado, médula ósea y timo [46]. En resumen, la capacidad intrínseca que posee AcMNPV de activar una respuesta inmune innata potente lo convierte en un candidato prometedor para su utilización como un vehículo vacunal [43].

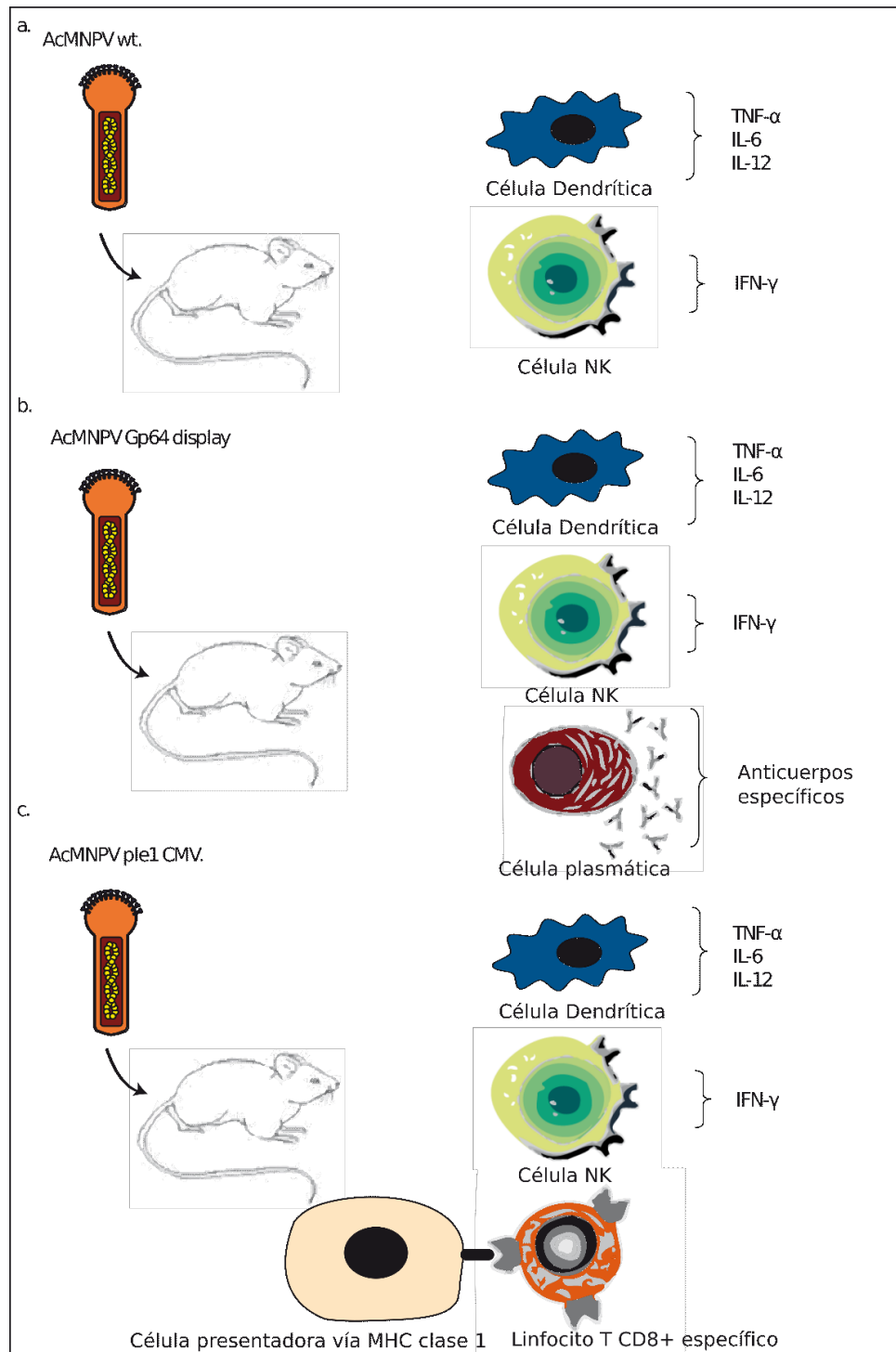


Figura I. 7 Resumen de los diferentes tipos de respuesta inmune inducida por baculovirus. a. Activación de células inmunes por la inoculación con AcMNPV *wild type*. b. Respuesta inmune generada por AcMNPV realizando display de antígenos fusionados a GP64. c. Respuesta inmune generada por AcMNPV codificando para un antígeno específico bajo el control del promotor del gen *ie1* de CMV.

Baculovirus *surface display*

Los sistemas de expresión eucariotas son un modelo muy interesante para el estudio de grandes estructuras de proteínas eucarióticas y sus mecanismos de interacción ya que proveen las modificaciones postraduccionales y el plegamiento adecuados para ese tipo de proteínas, a diferencia de los sistemas de expresión procariotas que carecen de los mismos. Además, la exposición de una proteína determinada en la superficie de un virus resulta ser una estrategia exitosa para evaluar las diferentes interacciones de la misma así como sus propiedades antigénicas [36].

Se han desarrollado numerosas estrategias para la exposición de péptidos o proteínas heterólogas en la superficie del BV a través de la fusión de las mismas a la glicoproteína mayoritaria de los BV GP64. Por lo general, estas estrategias incluyen una copia adicional del gen *gp64* de modo tal que los viriones recombinantes expresen tanto la proteína *wild type* (*wt*) como la proteína quimérica y conserven su infectividad. Además, se ha probado que los baculovirus que exponen proteínas heterólogas en su superficie son inmunógenos efectivos capaces de generar una respuesta humoral específica contra dichas proteínas [32].

Dado que los baculovirus son capaces de generar una respuesta innata robusta a través de la activación de las APC, es esperable que la inoculación con baculovirus recombinantes que expresen un antígeno heterólogo en su superficie puedan desarrollar una respuesta específica contra dicho antígeno. De hecho, numerosos estudios han mostrado que baculovirus recombinantes que expresan proteínas GP64 quiméricas en su superficie fueron capaces de desarrollar una respuesta humoral muy fuerte específicamente dirigida al antígeno expuesto superficialmente (Figura I.7.b). Xu y colaboradores demostraron que la inoculación de modelos animales con baculovirus que expresaban en su superficie antígenos de diferentes proteínas del virus de la encefalitis japonesa (JEV) generó títulos altos de anticuerpos específicos que resultaron ser útiles para la protección en contra de la enfermedad. Más específicamente, encontraron que la inoculación con dichos vectores vacunales produjo una respuesta IgG específica y títulos altos de anticuerpos neutralizantes contra el virus, comparables a la vacuna a virus atenuado contra JEV [47-50].

Estos resultados fueron confirmados por diferentes grupos de investigación que utilizaron la técnica de baculovirus *surface display* para el desarrollo de vacunas de nueva generación para la protección contra diferentes enfermedades como reovirus aviar [51], enterovirus humano [52], influenza [53, 54], malaria [55], etc.

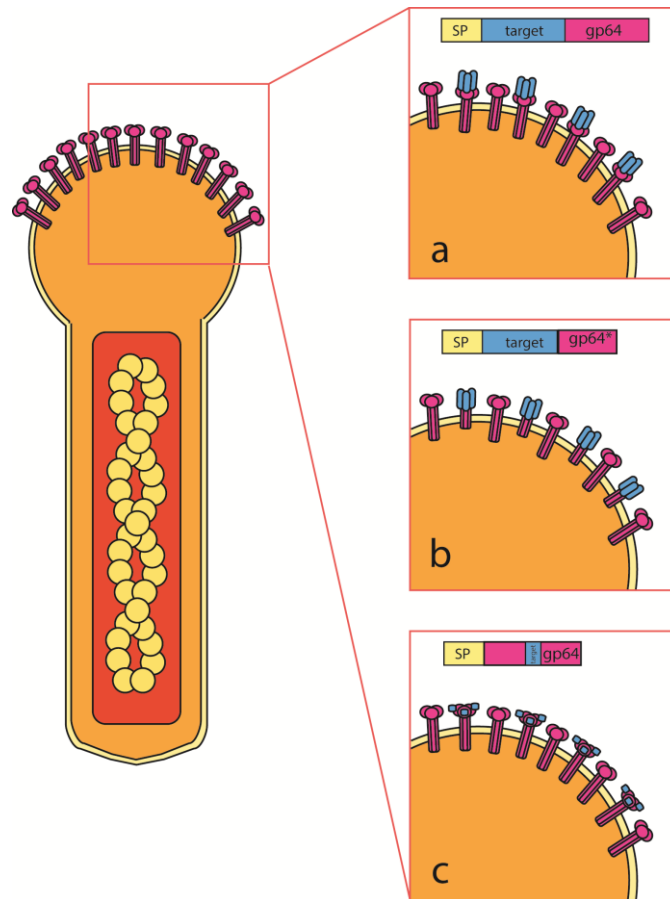


Figura I. 8 Esquema de diferentes estrategias para exposición superficial mediada por GP64. a. *Baculovirus surface display* con la proteína GP64 completa. b. *Baculovirus surface display* donde se conservan sólo los dominios transmembrana (TM), multimerización (MMD) y carboxilo terminal (CTD). c. *Baculovirus display* con una copia recombinante de GP64 que incluye en fase un péptido pequeño.

Proteínas quiméricas que conservan la proteína GP64 completa.

Como fue descrito anteriormente, existen diferentes estrategias para llevar a cabo la exposición de proteínas y péptidos en la superficie baculoviral. Una de ellas es la fusión de la proteína de interés a una copia adicional de la glicoproteína de superficie GP64 completa. De este modo, la proteína GP64 *wt* y la GP64 quimérica pueden ser incorporadas en la membrana celular y posteriormente en los BV. Para llevar a cabo esta estrategia las proteínas de interés fueron clonadas en un vector de transferencia de manera tal de obtener

una fusión intercalando la secuencia de la proteína heteróloga entre el péptido señal N-terminal y el resto de la proteína GP64, que conserva su extremo C-terminal (Figura I.8.a) [36, 56]. La conservación de la función biológica de muchas proteínas al ser expresadas en el sistema de baculovirus *surface display*, como por ejemplo la proteína GP120 de HIV, indica que es posible exponer proteínas de gran tamaño y estructura compleja en la superficie de los baculovirus de forma funcional.

La ventaja de este método sobre otras alternativas reside en que las secuencias que codifican para los aminoácidos necesarios para el transporte de la glicoproteína, su maduración e inclusión en los BV se encuentran presentes en la secuencia completa de GP64. A pesar de ello, la utilización del ORF completo puede acarrear problemas durante la instancia de clonado al gran tamaño del vector de transferencia resultante.

Inserción de péptidos dentro de GP64.

Otra estrategia muy utilizada consiste en incluir péptidos dentro de la estructura nativa de la proteína GP64 de AcMNPV con el objetivo de incrementar la avidez del antígeno expuesto. En este caso un péptido corto es insertado dentro de la secuencia que codifica para la GP64 *wt* en lugar de incorporar una copia adicional. Numerosos trabajos han demostrado que esta técnica resulta muy eficiente en la generación de una respuesta humoral robusta específica contra el péptido insertado. Sin embargo, dado que no existe una copia de GP64 *wt* que asegure la correcta fusión de membranas, la manipulación de la única versión de la proteína puede generar problemas en la infectividad de los baculovirus recombinantes. Por este motivo, los sitios para insertar péptidos foráneos deben ser elegidos cuidadosamente. Más aún, la longitud de los péptidos insertados también es una condición limitante, pudiéndose insertar péptidos de no más de 23 aminoácidos. Para péptidos mayores, una solución efectiva puede ser la inclusión de una copia adicional de GP64 [57] (Figura I.8.c).

Partículas pseudo-virales

El *pseudotyping* consiste en la sustitución de las proteínas de la envoltura natural del virus con proteínas de la superficie de otro virus. Esta estrategia conserva la infectividad del virus y permite la evasión de la inactivación mediada por el complemento. El método más ampliamente utilizado de *pseudotyping* de

baculovirus basa en el uso de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Un amplio número de trabajos han demostrado que la proteína G de VSV es capaz de mejorar la eficiencia de transducción de baculovirus en células de vertebrados [58-61] incluso pudiendo reemplazar a GP64 conservando la capacidad de infectar productivamente, replicar y propagarse en células de insecto Sf9 [62, 63]. Sin embargo, el *pseudotyping* se realiza típicamente expresando ambas proteínas de fusión, la molécula deseada y GP64.

Otros grupos de investigación también demostraron un aumento en el *delivery* de genes en modelos animales luego de una inoculación intramuscular directa con baculovirus pseudotipados con la proteína G de VSV con respecto a la inoculación con baculovirus sin haber realizado *pseudotyping* [61, 64]. Estos resultados sugieren que la modificación de la envoltura de los baculovirus puede cambiar sus propiedades inmunogénicas, su tropismo y protegerlos de la inactivación del complemento.

Baculovirus como vectores de transducción de células de mamífero

El ingreso de los baculovirus en células de mamífero es un evento de suma importancia no sólo para la inducción de respuestas inmunes específicas sino que también ha cobrado mayor relevancia más recientemente para el establecimiento de diferentes estrategias de terapia génica. Inicialmente se sugirió que la entrada baculovirus dependía de interacciones electrostáticas [58, 65]. Recientemente, Makkonen y colaboradores han demostrado que el heparan sulfato promueve la unión de los baculovirus y su entrada en células de mamífero [66]. Basándose en el mecanismo de la fusión de membranas mediada por GP64 y de la vía de entrada de los baculovirus en células de insecto, también se propuso que la endocitosis y macropinocytosis mediada por clatrina podría jugar un papel importante en la entrada de baculovirus [67, 68]. Por el contrario, Laakkonen y colaboradores [69] descubrieron que los baculovirus podían entrar en algunos tipos de células de mamíferos, tales como las células hepáticas, por una vía independiente de endocitosis y macropinocitosis mediada por clatrina lo que sugiere que la fagocitosis podría estar involucrada [70].

Estos datos sugieren que la vía de entrada de los baculovirus puede variar dependiendo del tipo celular y será necesario realizar más estudios para dilucidar los mecanismos completos. Sin embargo, todos los estudios determinaron que

proteína de la envoltura de los BV GP64 es fundamental para la entrada y para la activación de células dendríticas (DC) [41, 71, 72].

Una vez dentro de las células, los baculovirus son transportados al endosoma y a continuación, las nucleocápsides son liberadas por la fusión mediada por GP64 [73] y posteriormente transportadas al núcleo [69, 74] mediante un proceso que involucra la reorganización del citoesqueleto de actina [68, 75]. Dentro del núcleo, el DNA del baculovirus podría ser reconocido por la maquinaria de transcripción celular y finalmente podrían expresarse las proteínas recombinantes.

Baculovirus y la respuesta inmune celular.

Además de infectar determinados cultivos celulares de insecto, los baculovirus son capaces de ingresar en diferentes tipos celulares de otras especies animales como por ejemplo células humanas, de ratón, de conejo, porcinas, bovinas, de peces y células aviares y, de esta manera, transducir o introducir su DNA [76, 77]. Además, se ha observado que los baculovirus son capaces de transducir células madre embrionarias, células madre adultas y células madre pluripotenciales inducidas [70].

Los baculovirus son más seguros que otros vectores de transducción ya que no se ha observado integración de su DNA dentro del genoma de las células hospedadoras ni replicación viral [70, 78]. Asimismo ha sido demostrado que los humanos no poseemos anticuerpos ni células T específicas pre-existentes contra los baculovirus, a diferencia de otros vectores de transducción que deben sortear el obstáculo de la inmunidad pre-existente [79].

Entonces, la secuencia codificante para la proteína de interés puede incluirse en el genoma viral bajo el control de un promotor adecuado que sea reconocido por el organismo blanco. La inoculación posterior de un modelo animal con el baculovirus recombinante resulta en la expresión de la proteína heteróloga dentro de diferentes tipos celulares. La expresión de un polipéptido extraño en el interior celular conduce al procesamiento del mismo por la vía del proteasoma y a la presentación antigénica por la vía MHC de clase I. De esta forma, gracias a la capacidad adyuvante y a la posibilidad de transducir células de mamíferos, los baculovirus son capaces de inducir fuertes respuestas inmunes de tipo celular (Figura I.7.c).

Yoshida y colaboradores [55] han desarrollado un sistema de expresión dual basado en baculovirus con el objetivo de desarrollar vacunas multifuncionales

con la capacidad de inducir tanto una fuerte respuesta humoral como celular. Por otro lado, Hervas-Stubbs y colaboradores [38] demostraron que los baculovirus inducen fuertes respuestas inmunes humorales y celulares por la co-administración de tipo salvaje AcMNPV y un antígeno purificado. Demostraron que los viriones brotantes tienen fuertes propiedades adyuvantes, permitiendo la generación de respuesta humoral y respuesta citotóxica (CTL) contra el antígeno co-administrado. Observaron también que los baculovirus son capaces de inducir la maduración de las células dendríticas (DC) y la producción de mediadores de inflamatorios que actúan directamente sobre los linfocitos B *naïve* y los linfocitos T CD4 + y CD8 +, promoviendo la expansión clonal y la diferenciación de los mismos [80].

Otras Aplicaciones

El uso de baculovirus como vectores para la generación de la inmunidad no es la única aplicación posible para estos virus. Su capacidad para transducir células de mamífero y su capacidad para permitir la introducción de grandes cantidades de DNA heterólogo en sus genomas representan notables ventajas. En sumatoria con los beneficios de bioseguridad de los baculovirus en comparación con otros vectores virales, estas características hacen que los vectores basados en baculovirus sean atractivos para la transducción de vertebrados.

En esa línea, han surgido numerosos trabajos en los que los baculovirus han sido utilizados como vectores de terapia génica.

El presente trabajo de tesis doctoral abordará diferentes aplicaciones biotecnológicas de los baculovirus, más específicamente su uso como vector para la expresión de proteínas heterólogas aprovechando sus beneficios para el desarrollo de una plataforma simple y económica para el diagnóstico, su uso para la exposición superficial de antígenos y su capacidad vacunal y, finalmente, su uso como vector de transducción de células de mamífero tanto para la generación de respuesta inmune celular como para el desarrollo de estrategias de terapia génica.

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consiste en desarrollar una plataforma para la generación de baculovirus recombinantes (recBV) con la capacidad de exponer superficialmente antígenos (Baculovirus *Surface Display*) y, por otra parte, con la capacidad de mediar la transducción de genes en mamíferos.

Para evaluar las herramientas generadas se utilizarán dos modelos de estudio: En primer lugar, se planteó generar recBV para ser probados como una alternativa al diagnóstico y a la vacunación con cepas virales atenuadas contra la fiebre hemorrágica argentina (JUNV: virus Junín). En segunda medida, se propuso obtener recBV transductores capaces de inducir la expresión de RNA de interferencia con utilidad terapéutica contra tumores pituitarios.

Objetivos específicos

En el contexto del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos que serán desarrollados a lo largo del presente trabajo doctoral:

1. Expresión del precursor de la proteína de superficie GPC de JUNV en el sistema de células de insecto y baculovirus para su explotación en el diagnóstico y prevención de la enfermedad.
2. Diseño y construcción de un plásmido de transferencia para la expresión de proteínas de fusión con porciones de GP64 y su exposición en la superficie de partículas virales brotantes (BV) de AcMNPV.
3. Amplificación y clonado de diferentes secuencias comprendidas dentro del marco abierto de lectura (ORF) correspondiente a la glicoproteína de la superficie G1 de JUNV y obtención de los recBV.
4. Generación de vectores para la obtención de recBV con capacidad transductora con aplicaciones inmunológicas y en terapia génica.
5. Evaluación de la respuesta generada por los vectores baculovirales utilizados en diferentes modelos animales.

Capítulo II

Expresión de GPC en AcMNPV

Introducción

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) es una enfermedad aguda grave de etiología viral que se presenta con características endemoepidémicas en las llanuras agrícolas del centro de Argentina [81]. Su incidencia es principalmente estacional [82, 83].

Desde su aparición en la década de 1950, se han registrado epidemias anuales [84] con una alta tasa de letalidad durante los primeros años hasta que luego se redujo notablemente, primero con medidas de contingencia adecuadas y, más significativamente, con el uso de plasma inmune de pacientes convalecientes para el tratamiento [85, 86].

Los brotes anuales de FHA suelen ocurrir desde finales de verano hasta mediados del invierno, y coinciden con la cosecha de maíz y con el aumento de la población de roedores silvestres *Calomys musculinus*, entre otros [87]. Se cree que la aparición de la enfermedad a mediados de 1950 se debió a los cambios realizados en los diferentes hábitats naturales por parte de actividades humanas principalmente relacionadas con la agricultura. Estas modificaciones ambientales han favorecido el crecimiento de la población de *C. musculinus* y facilitaron su contacto con los seres humanos. Hay, sin embargo, casos urbanos en los que el origen de la infección no es fácil de establecer. Desde la primera descripción de la enfermedad en la década de 1950, se han observado brotes anuales ininterrumpidos en una región que se extiende progresivamente en el centro-norte de Argentina [84, 88].

En 1958, los casos se limitaron a un área de aproximadamente 16.000 km², con una población de riesgo estimada en 270.000 habitantes. En 1963, fueron confirmados casos en el sudeste de la provincia de Córdoba, y entre 1964 y 1967 se vieron afectadas nuevas zonas en la provincia de Buenos Aires y en el sur de la provincia de Santa Fe [89, 90]. En la actualidad, la región endemoepidémica se extiende por un área de aproximadamente 150.000 km², con una población estimada en más de 5.000.000 de personas [84].

La población en situación de riesgo se compone principalmente de los trabajadores del sector agropecuario, que se infectan con la orina, la saliva o la sangre de los roedores infectados que se dispersa en forma de polvillo y aerosoles en la época de la cosecha [87, 91].

La FHA presenta un período de incubación que puede variar de 6 a 12 días, terminando con la aparición de fiebre, por lo general asociado con un síndrome similar a la gripe que puede incluir mialgia, dolor de cabeza, bradicardia relativa, conjuntivitis, náuseas, vómitos y diarrea durante la primera semana. Los primeros síntomas de la insuficiencia cardíaca aguda difieren de las de las infecciones respiratorias agudas por la ausencia de dolor de garganta, tos o congestión nasal. Al final de la primera semana de la evolución, puede presentarse oliguria y diferentes grados de deshidratación, los síntomas neurológicos son comunes y, en pacientes de sexo femenino, suele presentarse metrorragia leve a moderada, siendo en algunos casos el primer síntoma de esta enfermedad. En la segunda semana de la enfermedad, alrededor de 75% de los individuos infectados comienzan a mejorar, mientras que el 25% desarrolla trastornos neurológicos más severos o hemorragia grave [83, 92, 93]. La fiebre persiste, mientras pueden observarse petequias en la mucosa oral y la región axilar, así como sangrado gingival. Asimismo, pueden presentarse signos hemorrágicos más severos incluyendo hematemesis, hemoptisis, epistaxis, hematomas, metrorragia y hematuria. También pueden presentarse síntomas de afectación del Sistema Nervioso Central en forma de hiporreflexia y confusión mental. Cuando es grave, puede progresar para incluir arreflexia, hipotonía muscular, ataxia, temblores y aumento de la irritabilidad, seguido de delirio, convulsiones generalizadas y coma (Figura II.1) [92, 94, 95].

La FHA se manifiesta clínicamente en casi 2 de cada 3 individuos infectados y la tasa de mortalidad puede alcanzar un 30% en los pacientes no tratados. La terapia más utilizada es el tratamiento con plasma inmune que consigue reducir la mortalidad a menos del 1%, aunque esta terapia específica es eficaz sólo cuando se inicia durante la primera semana de la enfermedad [83].

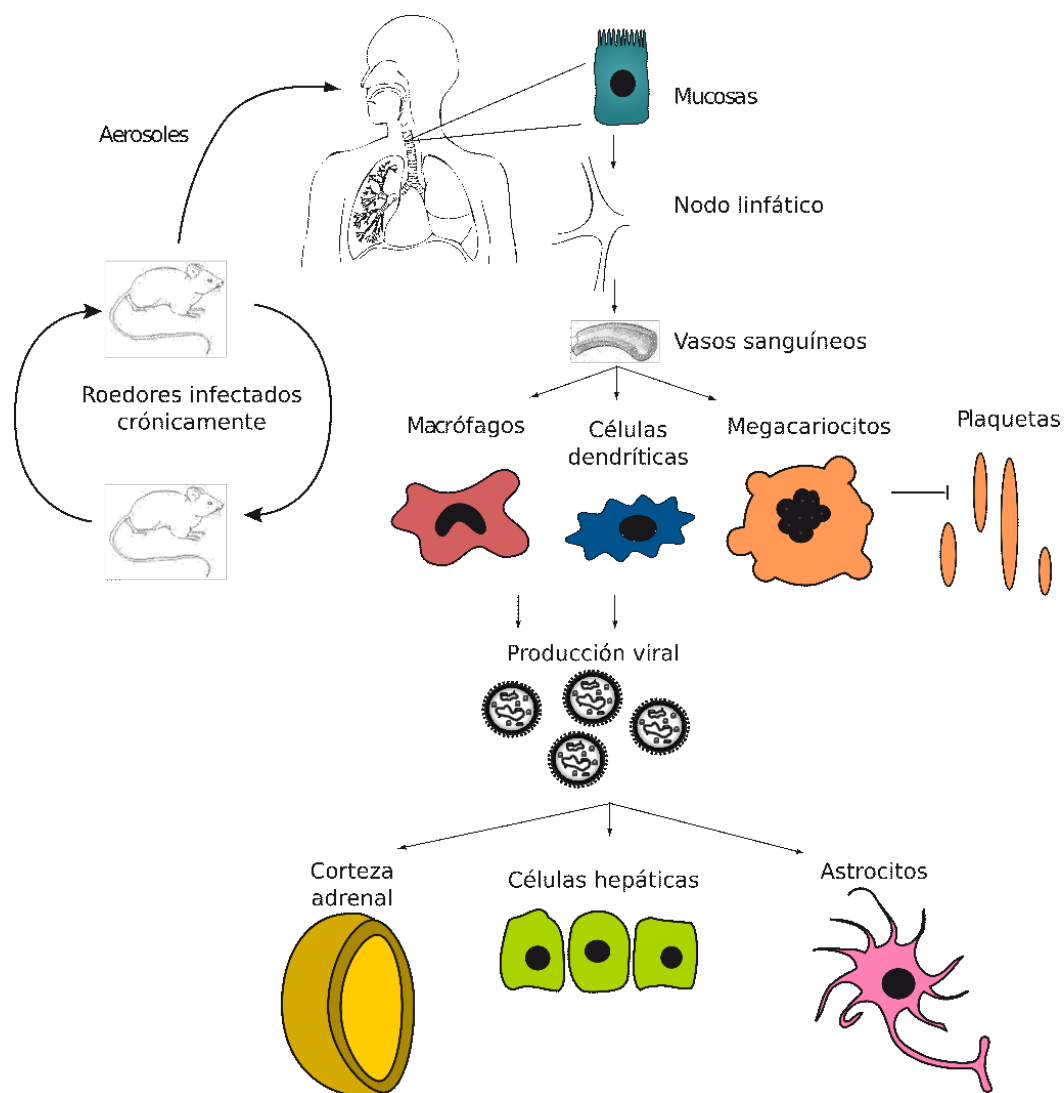


Figura II. 1 Esquema del ciclo del virus en la naturaleza y los tipos celulares afectados durante el curso de la FHA [91].

Esta enfermedad emergente fue reconocida por primera vez en 1955 y su agente etiológico se caracterizó y se denominó virus Junín (JUNV) por el sitio geográfico donde fue aislado por primera vez [96, 97].

El JUNV es transmitido por roedores y pertenece al género *Mammarenavirus* dentro de la familia *Arenaviridae* [98]. A su vez los *Mammarenavirus* pueden clasificarse serológica y geográficamente en arenavirus del viejo mundo (OW: *Old World*) y arenavirus del nuevo mundo (NW: *New World*). Al igual que otros miembros de la familia *Arenaviridae*, las partículas virales del JUNV son envueltas, pleomórficas, de aproximadamente 120 nm de diámetro y contienen

una o más copias de nucleocápsides circulares con simetría helicoidal acompañadas por un número variable de ribosomas [99, 100]. Su genoma consta de dos segmentos de cadena simple de RNA: S (*small* de ~3,5 kb) y L (*long* de ~7,3 kb). Cada segmento tiene dos marcos de lectura abiertos (ORF: *Open Reading Frame*) no solapados y de sentido opuesto [101]. Los ORF de polaridad opuesta están separados en ambos RNA por una región intergénica no codificante que forma una estructura secundaria estable [102, 103]. El segmento L codifica tanto para la proteína de matriz Z de 94 aminoácidos y para la RNA-polimerasa viral L dependiente de RNA de 2210 aa. El segmento S a su vez codifica tanto para la proteína de la nucleocápside N (564 aa), así como para el precursor de la glicoproteína GPC (485 aa) (Ghiringhelli et al, 1991; Goñi et al, 2006; Salvato et al, 2011). GPC se sintetiza como una única cadena polipeptídica y después de la traducción se escinde para producir las glicoproteínas del virión maduro G1 (192 aa), G2 (235 aa) y un péptido señal estable SSP (58 aa) [104, 105]. A su vez, SSP, G1 y G2 forman trímeros que decoran en forma de espículas la superficie del virus (Figura II.2).

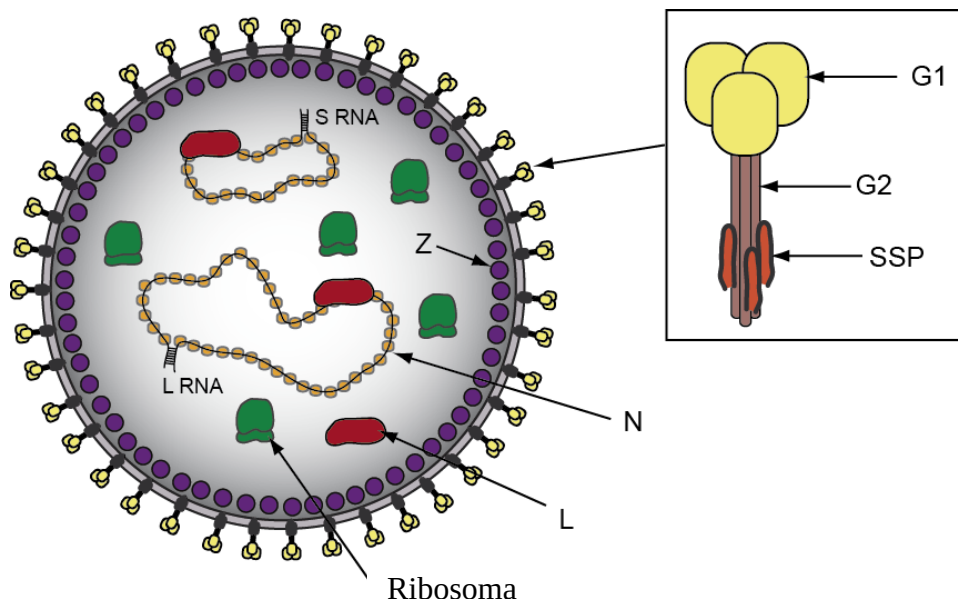


Figura II. 2 Esquema de la partícula viral de JUNV y de las espículas formadas por G1/G2/SSP [91].

La glicoproteína G1 está situada en la parte superior de la espícula y media la interacción del virus con receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora [106]. La glicoproteína G2 es similar a otras proteínas de fusión virales y es la encargada de mediar la fusión entre la membrana plasmática

celular y la envoltura lipídica viral [107]. El SSP, por su parte, es generado por escisión del polipéptido por la peptidasa señal, pero a diferencia de los péptidos señal convencionales es estable, inusualmente largo (58 aa.) y miristoilado [105]. Además, contribuye a la actividad fusogénica de G2 [108] a través de su región C-terminal [109, 110].

El ciclo replicativo de JUNV comienza con la interacción de G1 con el receptor de la transferrina humana (hTfR1) de la célula hospedadora. Esta interacción conduce a la endocitosis dependiente de clatrina. Cuando el endosoma se acidifica lo suficiente, la proteína G2 media la fusión de las membranas liberando el contenido del virión al citoplasma. Allí inicia la transcripción temprana y la expresión de las proteínas N y L. A continuación, ocurre la replicación del RNA viral. Este evento conduce a la transcripción tardía y la expresión de la proteína Z de matriz y la síntesis y maduración de las glicoproteínas de superficie. Finalmente, una vez localizadas las glicoproteínas en la superficie de la membrana plasmática la proteína Z media el ensamblado y brotación de las partículas virales [111] (Figura II.3).

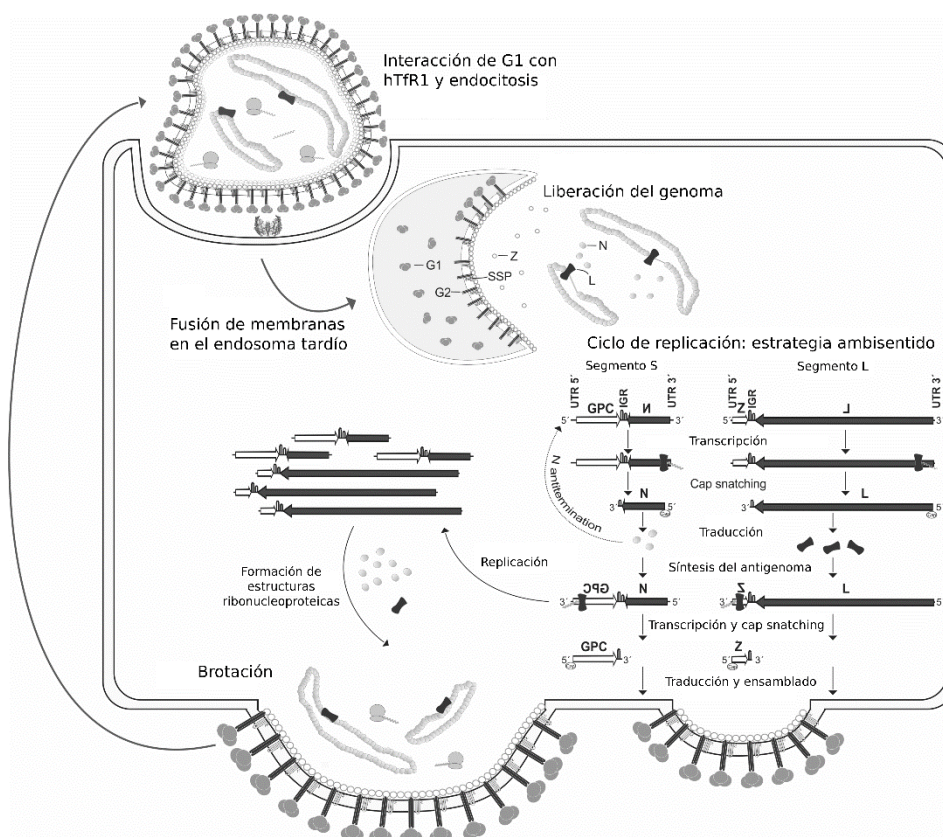


Figura II. 3 Ciclo replicativo de JUNV en una célula susceptible (Adaptado de Romanowski y colaboradores, 2017).

La FHA es una enfermedad de notificación obligatoria en Argentina. En la actualidad, el diagnóstico de FHA para establecer una terapia específica se basa en los datos clínicos y de laboratorio. Durante la fase temprana de la enfermedad, las manifestaciones clínicas son inespecíficas y se pueden confundir con varias condiciones febriles agudas. Por lo tanto, es necesario realizar recuentos de plaquetas. Si los valores obtenidos se encuentran por debajo de $100.000 / \text{mm}^3$ en combinación con recuentos de glóbulos blancos por debajo de $2500/\text{mm}^3$, y se trata de pacientes que habitan o frecuentan las zonas endémicas, pueden ser considerados individuos en riesgo [84].

La seroconversión se produce en etapas tardías de la infección, por lo que las pruebas serológicas no son marcadores útiles en las primeras etapas de la enfermedad. La aparición de anticuerpos neutralizantes anti-JUNV, que consisten principalmente en anticuerpos del subtipo IgG1, suele ocurrir a partir del día 12 [86]. El diagnóstico serológico, sin embargo, puede hacerse por fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia indirectos, ensayos de neutralización y ELISA. Debido a su sensibilidad y especificidad, ELISA es el método habitual de elección para el diagnóstico etiológico de los casos notificados de forma retrospectiva y para la vigilancia de la zoonosis [112, 113]. Más recientemente, un ELISA más preciso se desarrolló empleando la proteína JUNV N recombinante [114]. La inmunohistoquímica se utiliza generalmente para examinar muestras de órganos de autopsia y confirmar la etiología [93].

Dado que la terapia de plasma inmune es capaz de reducir la mortalidad cuando se realiza durante los primeros 8 días de la infección, la disponibilidad de pruebas que permitan el diagnóstico rápido y temprano es fundamental, así como herramientas moleculares que permitan la correcta y eficiente elección de los plasmas inmunes más eficientes para la neutralización del virus y por ende para el tratamiento. En este contexto, se estableció un ensayo basado en RT-PCR para el diagnóstico rápido validado con muestras de pacientes [82, 115]. Más recientemente, fue posible detectar $0,5 \text{ TCID}_{50}$ a partir de muestras de cultivo celular infectado con JUNV a través de un ensayo de RT-PCR en tiempo real [116]. Sin embargo, este último ensayo aún no ha sido utilizado con muestras clínicas o en el campo. En la actualidad, el análisis de RT-PCR para detectar el genoma de JUNV parece ser la prueba más sensible, rápida y temprana para el diagnóstico específico de la infección.

Actualmente se encuentran disponibles anticuerpos monoclonales específicos de JUNV (mAb) y por ende pueden encontrarse aplicaciones interesantes para el análisis de muestras de sangre u otro tejido de pacientes o roedores salvajes capturados en los programas de vigilancia epidemiológica [117, 118].

Un esfuerzo de colaboración llevado a cabo por los gobiernos de Estados Unidos y Argentina en la década de 1980 llevó a la producción de una vacuna a virus atenuado contra el virus Junín [119]. La disponibilidad de la vacuna contribuyó a una reducción sustancial en el número de casos con insuficiencia cardíaca aguda en los últimos años [84, 120]. Sin embargo, dada su naturaleza de virus atenuado, la vacuna no puede ser suministrada a infantes, individuos inmunodeprimidos o inmunocomprometidos como embarazadas. Es por ello, que resulta necesaria la generación de vectores vacunales alternativos para de ese modo alcanzar a todos los sectores de la población.

Dada la importancia del complejo G1/G2/SSP en el ingreso y la infectividad de JUNV, resulta de particular interés expresar el precursor GPC en un sistema adecuado que permita obtener cantidades significativas de la proteína procesada correctamente.

En ese sentido, los vectores de expresión basados en baculovirus son muy ventajosos debido a los altos niveles de expresión cuando el ORF de interés se encuentra bajo el control del promotor de muchos de los genes tardíos. Los baculovirus, como ya se ha mencionado anteriormente, son muy seguros dado que no pueden replicar fuera de su organismo hospedador y son de fácil manipulación en el laboratorio a diferencia de otros vectores virales [76]. Los baculovirus a los que se les ha incorporado la secuencia codificante para una proteína heteróloga son utilizados para infectar células de insecto o larvas donde se expresan altos niveles del producto heterólogo. Debido a que se trata de un sistema eucariota, este tipo de sistema de expresión provee muchas de las modificaciones post-traduccionales necesarias, a diferencia de los sistemas procariotas que no son capaces de hacerlo. Las células de insecto utilizadas en estos sistemas de expresión derivan de lepidópteros y su mantenimiento en cultivo es relativamente sencillo, ya que no requieren de una atmósfera controlada e incluso pueden adaptarse a crecer en un medio de cultivo sin suero.

Además, algunos tipos celulares de insecto pueden crecer en suspensión y de este modo permiten el escalado de la producción de proteínas recombinantes en biorreactores [121].

Cuando se genera un recBV para dirigir la expresión de una proteína heteróloga, suele utilizarse un promotor viral para controlar la expresión. Por esta razón los factores de transcripción virales suelen ser requeridos para la expresión del gen foráneo. Esto permite, además, contar con un sistema inducible por la infección viral.

Uno de los avances tecnológicos más importantes en la ingeniería genética de los baculovirus fue el desarrollo de genomas virales capaces de replicar en células bacterianas como cromosomas artificiales bacterianos. Estos recBV son llamados bácmidos y han sido modificados para contener los replicones clásicos de los cromosomas artificiales bacterianos. De esta forma, se puede propagar fácilmente el genoma baculoviral en bacterias [3].

Un problema frecuente a la hora de trabajar con bácmidos es la presencia de bácmido parental, es decir, de moléculas de bácmido no recombinante incluso en la misma colonia dónde se encuentra el bácmido modificado y a pesar de la selección con antibióticos o la selección blanco/azul. Para sortear este problema, se generaron bácmidos que incorporaron un sistema de selección negativa, para de este modo eliminar aquellas bacterias que contuvieran moléculas del bácmido parental. Finalmente, la tecnología de los bácmidos dio un salto hacia el desarrollo de sistemas que permitieron la generación de baculovirus sin *background*. Estos sistemas se basan en la recombinación homóloga entre un bácmido AcMNPV incapaz de replicar en células de insecto y un vector plasmídico de transferencia que incluye el gen de interés y el gen viral que falta en el bácmido. En uno de los sistemas, la deficiencia de la replicación se debe a una deleción en el gen esencial orf1629, y la recombinación entre el bácmido y el vector de transferencia (que contiene el orf1629) permite la recuperación del gen esencial. De este modo, sólo los recBV pueden replicar y no es necesario emplear un método tedioso de selección, facilitando la rápida obtención de recBV [122].

En este capítulo se describe la utilización del baculovirus AcMNPV como vector para la expresión del precursor de la glicoproteína de superficie del JUNV en cultivo celular de insecto y la aplicación del mismo como antígeno útil para la generación de memoria inmunológica, así como para su aprovechamiento como una herramienta para el diagnóstico.

Objetivos específicos

1. Clonado de la secuencia codificante para GPC en el vector de transferencia pBacPAK9 y generación del recBV.
2. Detección de la proteína recombinante en células de insecto infectadas.
3. Diseño de un inmunoensayo para la selección de plasma inmune específico y para el diagnóstico serológico.
4. Detección de la proteína recombinante en el recBV obtenido e inoculación del modelo animal.
5. Evaluación de la respuesta inmune humoral generada por el vector baculoviral utilizado.

Materiales y métodos

Construcciones plasmídicas

En nuestro grupo de trabajo contamos con la construcción pcDNA-GPC que contiene clonado el gen que codifica para el precursor de las glicoproteínas de JUNV (cepa MC2). Brevemente, el ORF fue reconstruido a partir de dos clones diferentes de una biblioteca de cDNA. Se generaron tres fragmentos de digestion y fueron clonados secuencialmente en el vector pBlueScript (Stratagene, Cedar Creek, TX). Luego, el inserto fue liberado mediante una digestion con las enzimas *Bam*HI y *Sac*II, se generaron extremos romos con la nucleasa S1 y se ligaron adaptadores *Bam*HI. Finalmente, luego de la digestion con dicha enzima, la secuencia del ORF de GPC fue clonada en el vector pcDNA.

A partir del vector pcDNA-GPC se liberó el ORF de GPC mediante digestión con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I y se subclonó el mismo en el vector de transferencia pBacPAK9 para la generación de recBV.

Obtención del baculovirus recombinante Ac-GPC

Se utilizó el sistema desarrollado por Je *et al.* (2001, 2003) [122], basado en un bácmido (genoma viral capaz de replicar en *E. coli*, denominado *bAcGOZA*) deficiente en el gen esencial ORF1629 y el rescate de DNA viral viable por recombinación con un plásmido de transferencia que contiene ese gen junto con otros que se desea expresar [123] [122]. Para ello, se cotransfectaron los DNA del plásmido de transferencia y del bácmido en células Sf9 con el reactivo *Cellfectin* II de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Figura II.4) y se monitoreó el cultivo celular hasta observarse la formación de poliedros. A continuación, se tomó el sobrenadante y se lo utilizó como inóculo para infectar un frasco T25 de células Sf9 al 70% de confluencia. La incorporación de la secuencia heteróloga de interés fue determinada por PCR utilizando como molde DNA viral extraído a partir del sobrenadante de infección (ver Capítulo VI: Materiales y métodos generales).

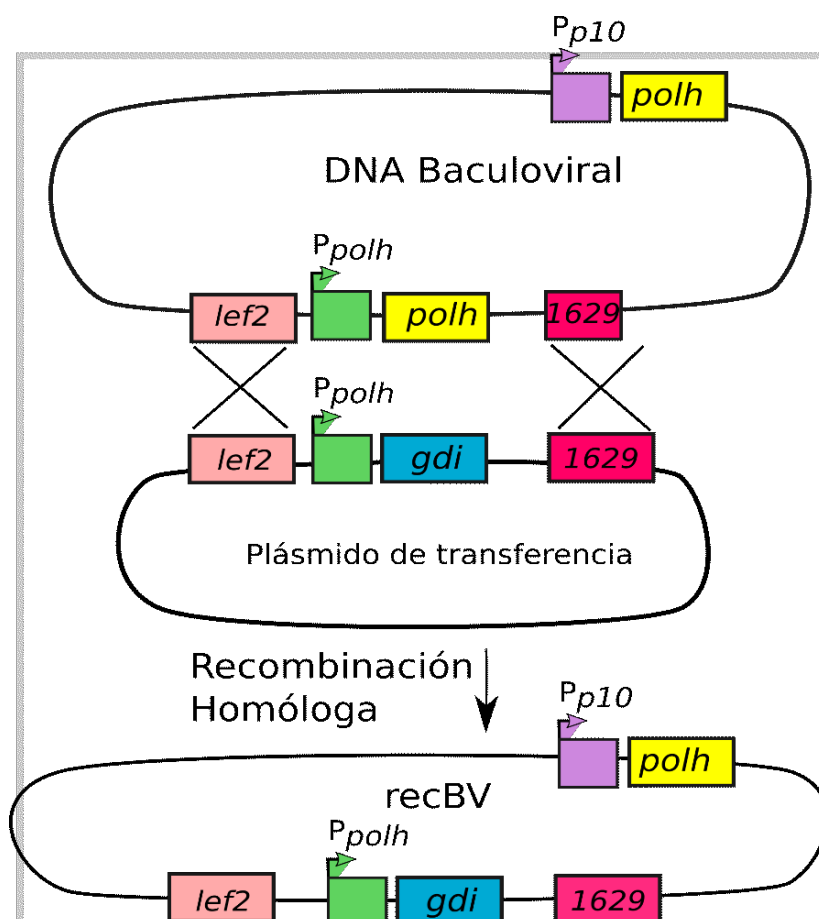


Figura II. 4 Esquema de la estrategia de doble recombinación homóloga en células de insecto para la generación de baculovirus AcMNPV recombinantes utilizando el bácmido bAcGOZA y el vector de transferencia pBacPAK9, dónde *gdi* representa al gen de interés que se desea incorporar en el recBV.

Expresión de la proteína GPC: SDS-PAGE y Western Blot

Las proteínas fueron visualizadas mediante SDS-PAGE (10% acrilamida) [Sambrook et al., 1989] y mediante tinción de los geles con *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25% p/v.

Para la realización de los ensayos de *Western Blot*, las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de PVDF (HybondTM-P; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) durante 30 minutos aplicando una diferencia de potencial de 15 V en el sistema semi-seco del equipo Trans-blot SD (BioRad, Hercules, CA).

La membrana fue bloqueada con una solución de 5% de leche descremada en PBS-0,1% Tween20 (PBS-T) durante una hora a 37°C. A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo primario, utilizando en algunos casos plasma

inmune policlonal proveniente de pacientes convalecientes y, en otros casos, el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05 [117]. En ambos casos se utilizó una dilución 1:400 y la incubación se realizó durante 2 horas a 37°C.

Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado en caso de haber utilizado el anticuerpo monoclonal como anticuerpo primario, o anti-humano biotinilado en caso de haber utilizado plasma inmune de pacientes previamente. En ambas situaciones se utilizó una dilución 1:500 y la incubación se desarrolló durante 1 hora a 37°C.

Luego, se realizó la incubación con estreptavidina conjugada a la enzima HRP (peroxidasa de rábano) en una dilución 1:1000 durante 1 hora a 37°C.

Luego de cada incubación, la membrana fue lavada tres veces con PBS-T durante 15 minutos. Finalmente se procedió al revelado incubando la membrana con una solución luminol 1.25 mM (Sigma, St. Louis, MO), ácido p-cumárico 200mM (Sigma) y H₂O₂ 2.7 mM en Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5. Las imágenes fueron obtenidas con el adquisidor EC3TM 500 (UVP, Upland, CA).

Determinación de la localización subcelular

Para determinar en qué región celular se localiza la proteína recombinante expresada en el sistema de baculovirus/células de insecto se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IF) empleando como fuente de anticuerpos primarios plasma inmune de pacientes convalecientes o el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05 y como anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-humano conjugados a diferentes fluoróforos o bien conjugados a biotina. En particular se utilizaron los anticuerpos anti-ratón-FITC, anti-humano-FITC y para revelar aquellas IF en las que se utilizaron anticuerpos conjugados con biotina se utilizó estreptavidina-PE. Las células Sf9 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio. Una vez alcanzada una confluencia del 60% fueron infectadas con los baculovirus correspondientes y 48 hs luego de la absorción del virus los preparados fueron fijados con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Se realizaron 3 lavados con solución de bloqueo (0,1% de suero fetal bovino en PBS) y, sin permeabilizar, las células fueron incubadas con los anticuerpos anteriormente descriptos.

ELISA

Se sembraron placas de 96 pocillos con células de insecto Sf9 infectadas con los recBV correspondientes (10^7 /ml) en buffer carbonato (pH 9.6) y se incubó durante la noche a 4°C. A continuación, la placa se bloqueó con 5% de leche descremada en PBS-T durante 1 hora a 37 °C para disminuir el pegado inespecífico. Luego de lavar la placa tres veces con PBS-T, se realizaron diluciones seriadas al medio de las muestras de suero (a partir de 1:16), incubando 2 horas a 37 °C. La placa se lavó tres veces con PBS-T y se incubó 1 hora a 37 °C con 50 µl de una dilución 1:2000 de IgG de cabra anti ratón biotinilado, seguido de la incubación con estreptavidina conjugada con HRP 1:4000. Finalmente, se lavó nuevamente tres veces con PBS-T y se reveló con 1 mg/ml de o-fenilendiamina (OPD) en *buffer* citrato-fosfato pH 5 (24,3% ácido cítrico 0,1M, 25,7% fosfato disódico 0,2M), más 1 µl/ml de agua oxigenada de 30 volúmenes. La reacción prosiguió durante 15-20 min y se detuvo agregando 50 µl de ácido sulfúrico 4N en cada pocillo. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (TP-reader, Thermo) y fue normalizada con el valor de la absorbancia de los controles.

Ensayo de inoculación de células Sf9 infectadas en ratones BALB/c

Se infectaron células Sf9 el recBV Ac-GPC. Como control negativo del ensayo se utilizaron células Sf9 infectadas con el baculovirus control Ac-DsRed que expresa la proteína fluorescente roja. Luego de 72 hs se resuspendieron las células en PBS y se inocularon hembras BALB/c de 7 semanas de edad con 100 µl de suspensión celular (10^7 células) por vía subcutánea. Se inocularon en total 12 animales repartidos en 3 grupos de 4 animales cada uno. El tercer grupo correspondió al control positivo del ensayo en el que los animales se inocularon con la cepa vacunal Candid#1. Antes de cada inoculación se tomaron muestras de sangre de cada animal y se realizaron re-inoculaciones cada 15 días.

Preparación de los inóculos de viriones brotantes

Se infectaron células High Five™ con los diferentes recBV y luego de 72 hs se colectó el sobrenadante. Los BV se centrifugaron a 14.000 rpm durante 40 minutos y se resuspendieron en PBS.

Inmunización de ratones BALB/c con viriones brotantes (BV)

Se utilizaron inóculos de BV parcialmente purificados. Se inocularon 8 ratones BALB/c hembras por vía subcutánea con el baculovirus Ac-GPC o el baculovirus control Ac-DsRed (10^8 partículas virales por animal). Cada 14 días se repitieron las inoculaciones y se obtuvieron muestras de suero de cada ratón. Finalmente, 14 días luego de la tercera inoculación se sacrificó a los animales y se tomó la mayor cantidad posible de suero mediante extracción troncal.

A continuación, se mezclaron volúmenes iguales de alícuotas de sueros de los animales correspondientes al mismo grupo experimental. Se utilizó una dilución 1/50 de los sueros para realizar un ensayo de inmunofluorescencia frente a una monocapa de células A549 infectadas con JUNV siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

Resultados

Amplificación y clonado de GPC de JUNV en el vector de transferencia pBacPAK9

A partir del vector pcDNA-GPC, se amplificó por PCR el ORF completo de GPC utilizando los *primers* específicos *gpcFw* y *gpcRv* e incorporando los sitios de restricción *Bam*HI y *Sac*I. Posteriormente, se clonó el producto de PCR en el vector de transferencia pBacPAK9 utilizando los sitios indicados. La Figura II.5 muestra los productos de digestión de 6 de los clones obtenidos de los cuales 5 resultaron ser positivos.

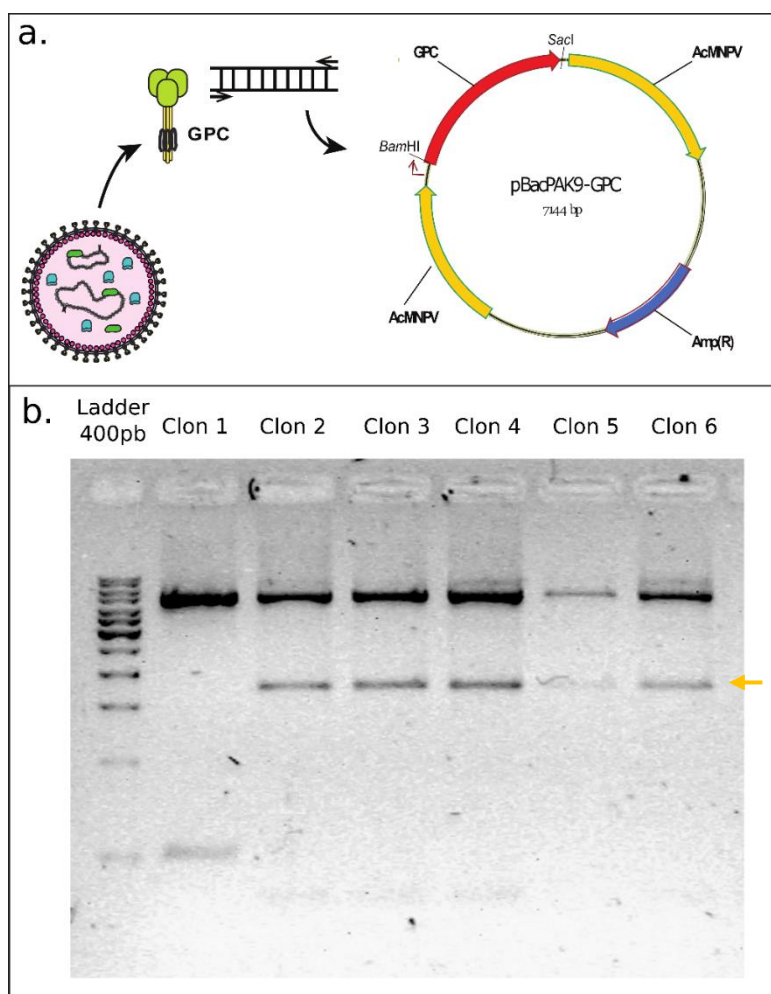


Figura II. 5 a. Esquema del clonado de GPC en el vector pBacPAK9 en el que las secuencias de homología con el genoma viral para la recombinación se encuentran en amarillo. b. *Screening* del clonado de GPC de JUNV en el vector pBacPAK9 por liberación del inserto con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sac*I observándose la banda de ~1600 pb correspondiente al ORF de GPC.

Obtención del baculovirus recombinante Ac-GPC

Se realizó la co-transfección de células Sf9 con el DNA del bácmido bAcGOZA y del vector de transferencia pBacPAK9-GPC de acuerdo al método descrito anteriormente. Luego de 96 hs post-transfección se observó la aparición de poliedros (signo característico de la infección por baculovirus). Se tomaron los sobrenadantes y se los utilizó como inóculo para infectar nuevas células, observándose nuevamente signos de infección (Figura II.6.b).

Posteriormente, se realizó una extracción rápida de DNA viral y se lo utilizó como molde para la realización de una PCR con *primers* específicos de la proteína GPC. La figura II.6.a muestra una corrida electroforética de los productos de dicha amplificación, confirmando la incorporación del ORF heterólogo en el genoma de AcMNPV, dando origen de este modo al recBV que llamamos Ac-GPC.

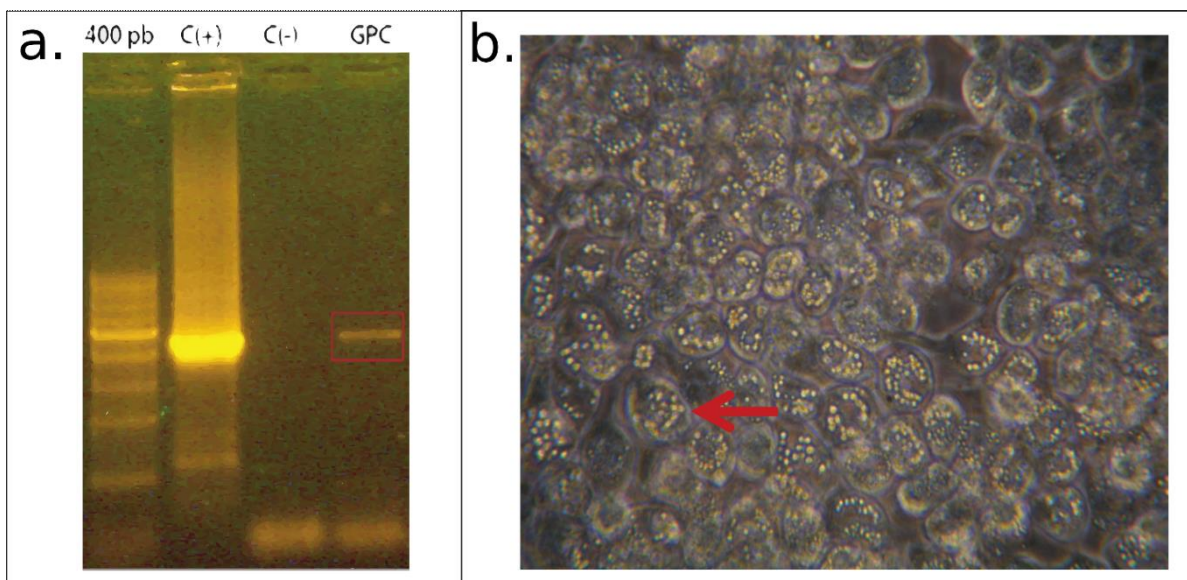


Figura II. 6 Obtención del baculovirus recombinante Ac-GPC. a. Confirmación por PCR de la incorporación de la secuencia codificante para GPC en el genoma baculoviral utilizando como molde una extracción de DNA genómico a partir de viriones brotantes. b. Infección de una monocapa de células Sf9 con el sobrenadante de la co-transfección del bAcGOZA y el vector de transferencia, observándose la formación de poliedros (flecha roja).

Caracterización de la expresión de la proteína GPC

Se infectaron células Sf9 y High Five™ con el baculovirus Ac-GPC y se observó la aparición de poliedros. Debido a que el ORF heterólogo GPC se encuentra bajo el control del promotor de la poliedrina, se tomó como referencia la aparición

de cuerpos de oclusión para proseguir con el procesamiento de las muestras de cultivo infectado. Las muestras procesadas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y la tinción con *coomasie blue* reveló la aparición de una banda diferencial de entre 60 y 70 kDa presente en las muestras provenientes de cultivos celulares infectados con el virus Ac-GPC (Figura II.7). Estos resultados son consistentes con el tamaño esperado para dicha proteína.

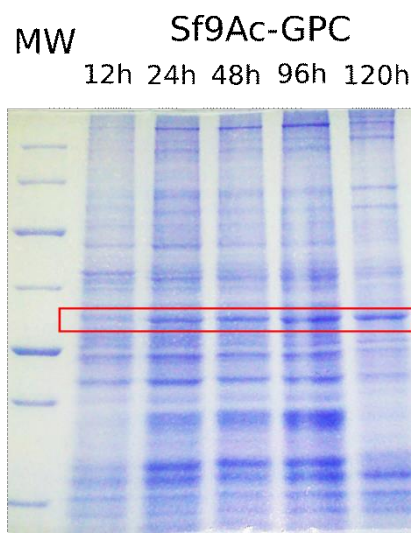


Figura II. 7 SDS-PAGE de lisados de células Sf9 infectadas con Ac-GPC. Análisis temporal de la expresión de la proteína GPC (75 kDa) en células Sf9 infectadas con Ac-GPC.

Paralelamente, se realizaron ensayos de Dot Blot en los que se inmovilizaron células infectadas con el baculovirus Ac-GPC y células infectadas con el baculovirus control Ac-DsRed. La Figura II.8 muestra que la proteína recombinante GPC es reconocida por sueros de pacientes convalecientes de FHA y por sueros de pacientes vacunados con la cepa atenuada Candid#1.

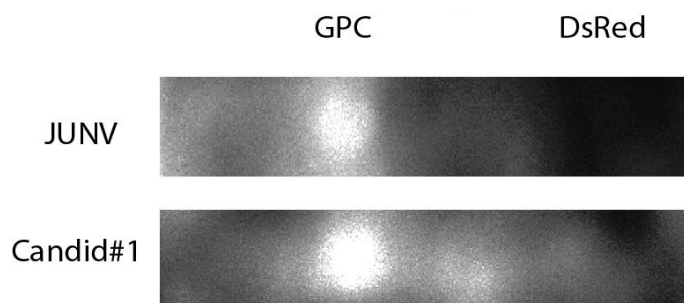


Figura II. 8 Dot Blot de un extracto de células Sf9 infectadas con Ac-GPC (GPC) o infectadas con el baculovirus control Ac-DsRed (DsRed) revelado con anticuerpos de plasma inmune de un paciente convaleciente de JUNV (panel superior) o plasma inmune de un individuo sano vacunado con la cepa vacunal Candid#1 (panel inferior).

Por otra parte, se realizaron ensayos de *Western Blot* para confirmar la identidad de la proteína de ~70 kDa observada en los SDS-PAGE. Se identificó una única banda del tamaño esperado al ser revelado tanto por anticuerpos monoclonales anti-GPC así como con plasma policlonal de paciente (Figura II.9)

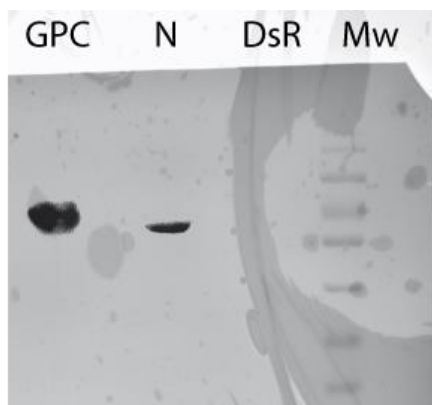


Figura II. 9 Análisis de *Western Blot* de lisados de células Sf9 infectadas con los baculovirus Ac-GPC (GPC) Ac-N (N) y AcDsRed (DsRed); revelado con un plasma inmune de un paciente convaleciente de alto título neutralizante.

Localización subcelular de la proteína recombinante

Debido a que el recBV Ac-GPC contiene la secuencia completa del ORF del precursor de la glicoproteína de superficie de JUNV, incluyendo su péptido señal, resultó de gran interés poder dilucidar si dicha glicoproteína podía ser reconocida por el sistema de síntesis y procesamiento de glicoproteínas de las células de insecto y dirigida a través de la vía secretoria a la membrana plasmática celular.

Para poder responder este interrogante, los cultivos celulares infectados con el virus recombinante se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta sin permeabilización. La Figura II.10 muestra una inmunofluorescencia realizada sobre células Sf9 infectadas con Ac-GPC o con el baculovirus AcMNPV-*wt* y un baculovirus que expresa la proteína N de JUNV, Ac-N(JUNV), utilizados como control. En este caso en particular se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05. Como puede observarse en el panel superior de la figura, la proteína recombinante GPC se localizaría en la superficie de la membrana plasmática celular.

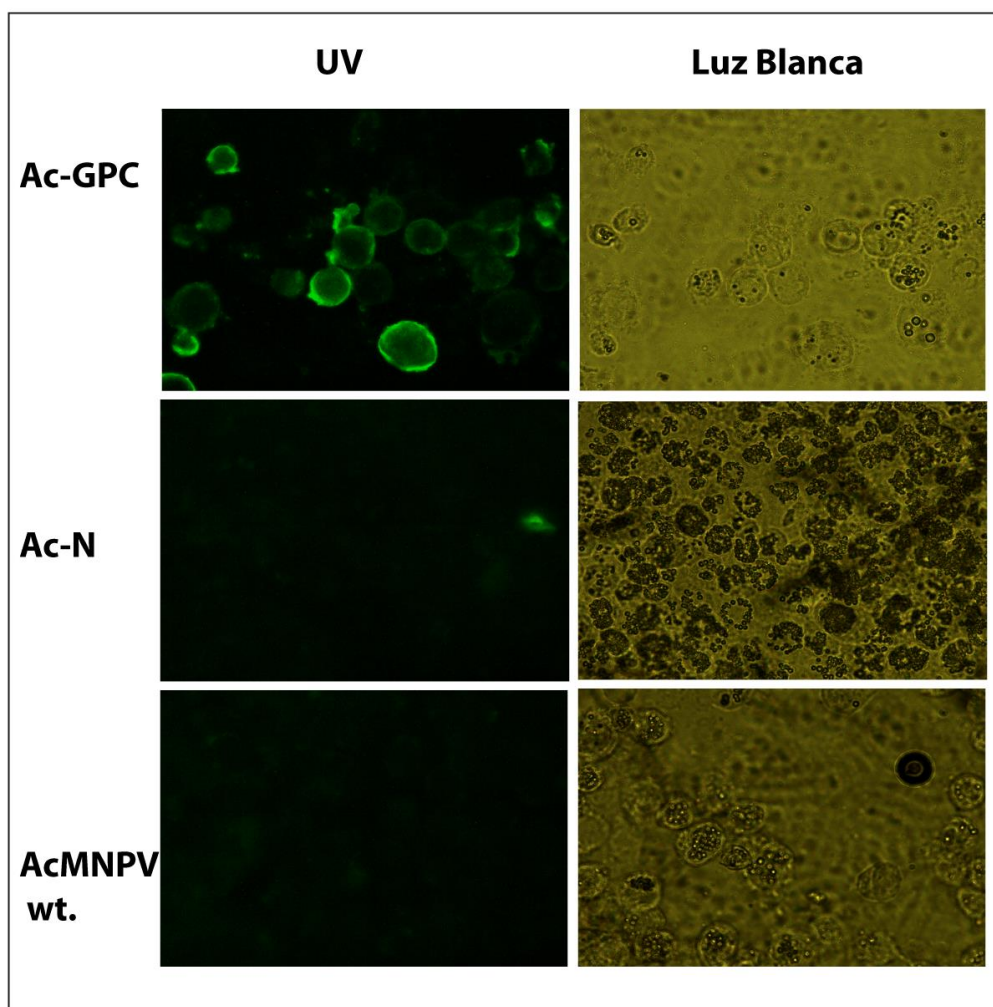


Figura II. 10 Inmunofluorescencia sobre células Sf9 infectadas con los baculovirus Ac-GPC, Ac-N y AcMNPV wt. utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05 y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el fluoróforo FITC.

Esta metodología se repitió empleando células High Five™, que suelen presentar una mayor eficiencia en la producción de proteínas recombinantes (Figura II.11). Además, se utilizó plasma inmune de un paciente convaleciente de FHA como fuente de anticuerpo primario, confirmándose los resultados observados anteriormente. En este conjunto de resultados se utilizó como baculovirus control el baculovirus Ac-GP37 que expresa una glicoproteína que no presenta reactividad con los anticuerpos ensayados.

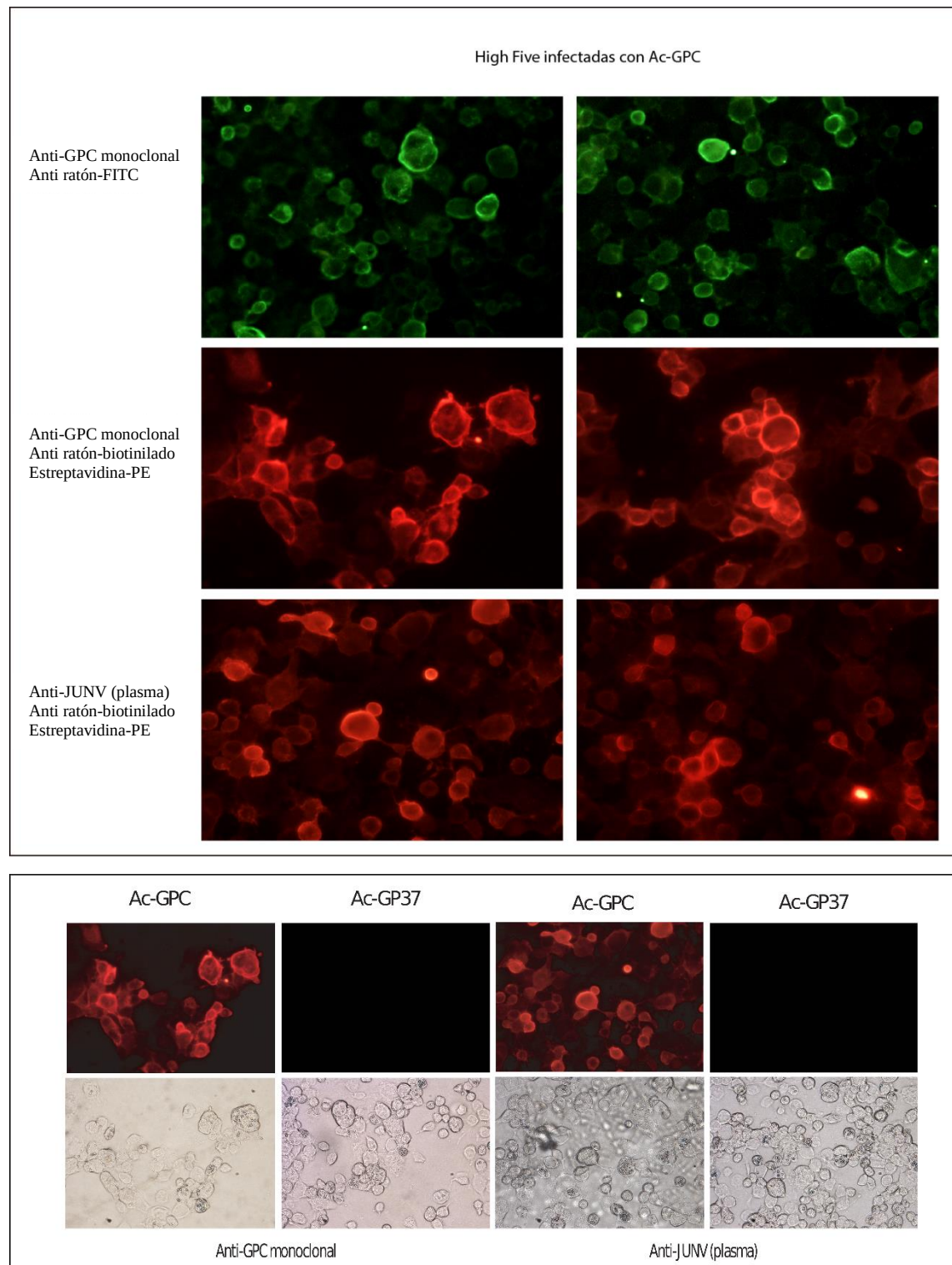


Figura II. 11 Inmunofluorescencia sobre células High FiveTM infectadas con los baculovirus Ac-GPC y Ac-GP37 utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05 o bien plasma inmune de paciente convaleciente (anti-JUNV), como anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el fluoróforo FITC, anti-ratón biotinilado y anti-humano biotinilado; y como anticuerpo terciario estreptavidina conjugada al fluoróforo ficoeritrina (PE).

Desarrollo de un ELISA de diagnóstico y de selección de plasmas inmunes

Aprovechando la localización superficial de la glicoproteína GPC tanto en células Sf9 como en células High Five™, se planteó el desarrollo de un inmunoensayo de tipo ELISA que permitiera determinar la reactividad de plasmas y sueros inmunes sin necesidad de manipular JUNV, ni de purificar proteínas.

Así, se puso a punto un ELISA que utiliza como *coating* células de insecto previamente infectadas con el baculovirus Ac-GPC. Para poder elegir las mejores condiciones experimentales, se utilizaron como control células infectadas con el baculovirus Ac-DsRed. Este baculovirus, además de no presentar reactividad cruzada con los anticuerpos a ensayar, tiene la particularidad de expresar la proteína fluorescente roja DsRed bajo el control del promotor de poliedrina. Dado que el virus Ac-GPC expresa la proteína recombinante bajo el control del mismo promotor, usando inóculos virales con títulos similares, la aparición de fluorescencia roja en el cultivo control pudo ser utilizada como referencia de la expresión de genes tardíos y como criterio para proseguir con el procesamiento de las muestras.

Se probaron diferentes condiciones de *coating* como por ejemplo: la utilización de buffer fosfato, de buffer carbonato, etc. Además, se realizaron *coatings* con células previamente infectadas con ambos tipos de buffers y *coating* con las células cultivadas en la placa de ELISA e infectadas *in situ*.

De todas las alternativas ensayadas, los mejores rendimientos se obtuvieron infectando los cultivos celulares con los diferentes virus en frascos de cultivo, y luego resuspendiendo las células en buffer de *coating* carbonato/bicarbonato pH 9,6, sembrándolas e incubándolas ON a 4°C.

Una vez realizado el bloqueo de acuerdo a la metodología descrita en Materiales y métodos, se incubaron las placas con diluciones crecientes seriadas de anticuerpo primario con un factor 1:2 partiendo de una dilución inicial 1:200. Los anticuerpos secundarios biotinilados fueron utilizados en una dilución 1:2000 mientras que la estreptavidina-HRP fue utilizada en una dilución 1:4000.

La Figura II.12 muestra, a modo de ejemplo, los resultados del ELISA utilizando algunos sueros provistos por el Instituto de Enfermedades Virales Humanas (INEVH), el anticuerpo monoclonal anti-GPC y un suero negativo.

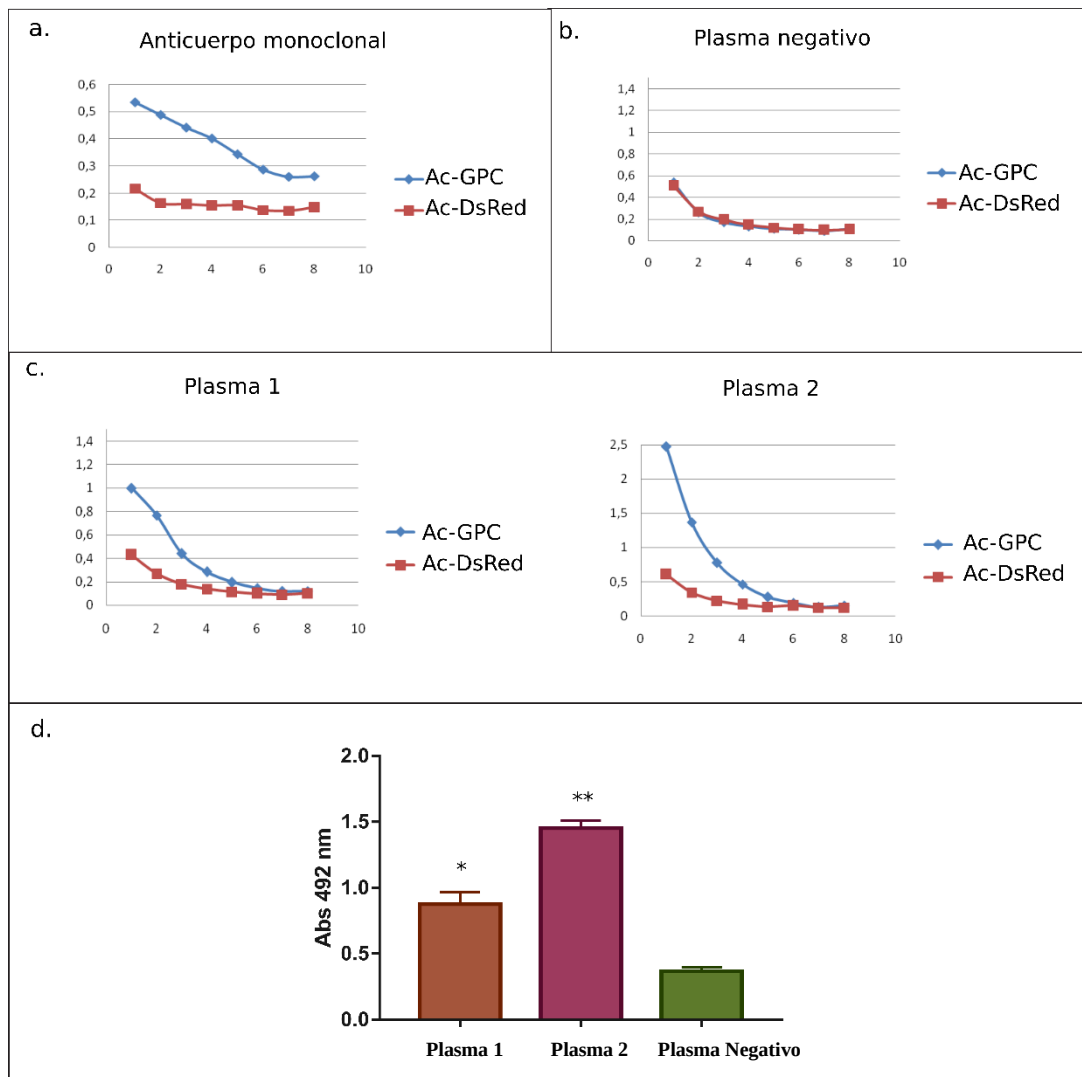


Figura II. 12 ELISA utilizando células Sf9 infectadas con Ac-GPC o Ac-DsRed enfrentándolas al anticuerpo monoclonal (a) y a plasmas inmunes provistos por el Instituto de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) de pacientes convalecientes (c) o pacientes sanos (b).

De acuerdo a los resultados observados en los ELISA mostrados en la figura II.12, se tomó como punto de corte un valor de absorbancia de 0,4 y la dilución 1:800 como aquella que permite la mejor discriminación entre sueros positivos y negativos.

A continuación, se ensayaron 60 plasmas sospechosos provistos por el INEVH y 100 plasmas negativos para JUNV, con el objetivo de desafiar el ensayo desarrollado y determinar su sensibilidad y especificidad. Los resultados obtenidos para cada plasma a través del ELISA fueron comparados con los resultados provistos por el INEVH y con los obtenidos a través del ELISA que utiliza la proteína N recombinante como *coating* (ELISA N) anteriormente desarrollado en nuestro laboratorio y publicado por Ure y colaboradores [114].

La Tabla II.1 resume de forma comparativa los resultados obtenidos para cada suero con el ELISA GPC desarrollado en el presente trabajo doctoral, los resultados del ELISA desarrollado de rutina que utiliza células Vero infectadas con JUNV como *coating*, provistos por el INEVH, y los resultados del ELISA N que utiliza la proteína N de JUNV recombinante como *coating*, provistos por Ure y colaboradores, para el mismo conjunto de plasmas.

ID Ensayo	ID INEVH	Reactividad		
		ELISA INEVH	ELISA rN	ELISA GPC
1	54267	NEG	NEG	NEG
2	57034	DUDOSO	NEG	NEG
3	50599	POS	POS	POS
4	50968	S/D	POS	POS
5	50728	POS	POS	POS
6	56793	POS	POS	POS
7	52615	POS	POS	POS
8	56504	NEG	POS	POS
9	50964	POS	POS	POS
10	54355	NEG	NEG	NEG
11	52022	POS	POS	POS
12	55403	POS	POS	POS
13	55291	POS	POS	NEG
14	52301	NEG	POS	NEG
15	52363	POS	POS	POS
16	54929	POS	POS	POS
17	51128	POS	POS	POS
18	Gut	POS	POS	POS

Tabla II. 1 Resumen de los resultados obtenidos para 18 de los 160 plasmas ensayados por el ELISA que utiliza células Sf9 infectadas con Ac-GPC como *coating*. También se incluyen los resultados obtenidos para cada plasma a través del método diagnóstico utilizado por INEVH y el ELISA N desarrollado previamente por Ure y colaboradores. En rojo se muestran dos casos de discrepancia.

Utilización de células Sf9 infectadas con Ac-GPC como inmunógeno en ratones BALB/c

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína GPC expresada en células de insecto se realizó inicialmente un ensayo *in vivo* utilizando como antígeno particulado células Sf9 infectadas con el baculovirus Ac-GPC. Los resultados mostrados en la Figura II.13.a corresponden a los sueros obtenidos 15 días post-inoculación para cada uno de los tres grupos. Dichos sueros fueron analizados mediante un ELISA utilizando como *coating* células Vero infectadas con JUNV. Como puede observarse en los gráficos no existen diferencias significativas en la reactividad de los sueros obtenidos a partir de los tres grupos experimentales.

Lo mismo sucedió a los 30 días post-inoculación (Figura II.13.b). La Figura II.13.c muestra la aparición de anticuerpos IgG específicos contra JUNV en todos los grupos a excepción del grupo control inoculado con células infectadas con el baculovirus Ac-DsRed. Además, los sueros obtenidos y utilizados como anticuerpos primarios para este ELISA muestran un comportamiento dependiente de la dosis.

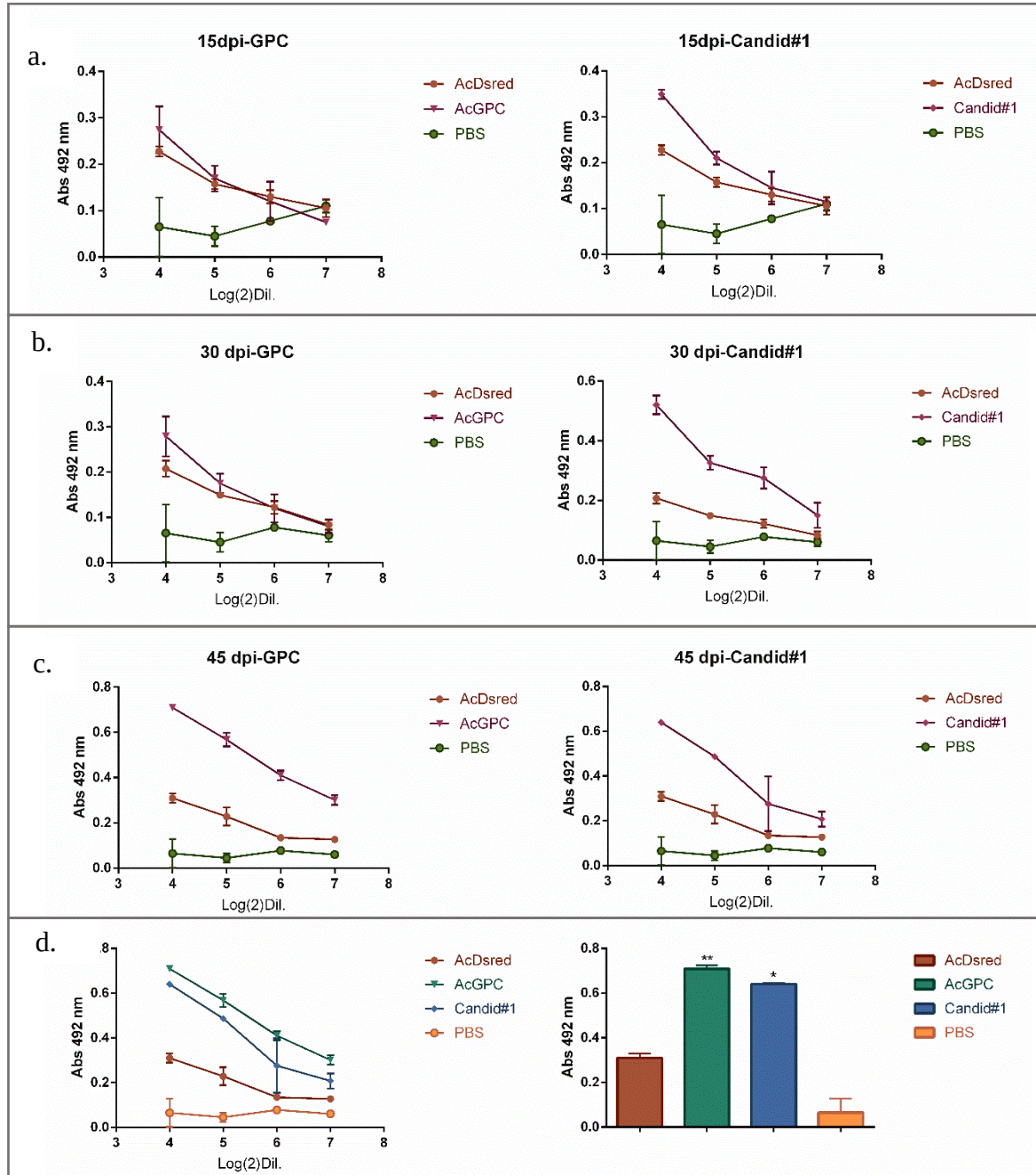


Figura II. 13 Análisis de ELISA. El *coating* se realizó con células Vero infectadas con JUNV. Se evaluó la reactividad de los sueros extraídos de los ratones BALB/c pertenecientes a los tres grupos experimentales Sf9-AcDsRed, Sf9-AcGPC y Candid#1. Por otra parte, se utilizó como control PBS en lugar de anticuerpo primario. El ensayo se realizó utilizando los sueros extraídos a los 15 (a), 30 (b) y 45 días luego de la primera inoculación (c y d).

Incorporación de GPC en la superficie de los BV

Los BV utilizan la membrana plasmática celular para constituir su envoltura lipídica al momento de brotar de la célula hospedadora. Dado que pudo observarse que la glicoproteína GPC fue capaz de localizarse en la superficie celular, resultó interesante determinar si el virus Ac-GPC al brotar incluye en su envoltura la proteína recombinante. Consecuentemente, se realizó un experimento indirecto con el objetivo de determinar si el baculovirus Ac-GPC se encuentra o no tapizado por la glicoproteína del JUNV.

Se incubaron células Vero con el virus Ac-GPC durante una hora; debido a que Ac-GPC es capaz de fusionar su membrana a la membrana celular, pero no es capaz de dirigir la expresión de la proteína recombinante ya que la misma se encuentra bajo el control de un promotor de insecto. La presencia de GPC en la superficie de las células Vero no podría deberse más que a la presencia de GPC en la superficie del virus.

Para evidenciar esto, se realizó un análisis por citometría de flujo de las células Vero utilizando anticuerpos monoclonales anti-GPC como anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con FITC.

La Figura II.14 muestra que la intensidad de fluorescencia es 100 veces mayor en células Vero tratadas con el baculovirus Ac-GPC en comparación con aquellas células tratadas con AcMNPV *wt.*

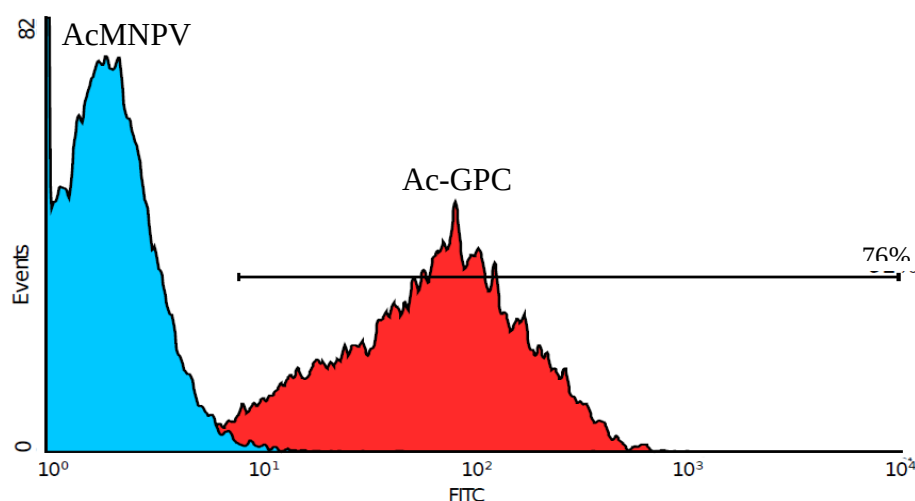


Figura II. 14 Citometría de flujo realizada con células Vero enfrentadas al baculovirus Ac-GPC o AcMNPV *wt.* para evidenciar la fusión de membranas por transección. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05 y como anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC. El gráfico muestra el número de eventos en función de la cantidad de fluorescencia para células Vero incubadas con Ac-GPC (rojo) y AcMNPV *wt.* (celeste).

Utilización del baculovirus Ac-GPC como inmunógeno en ratones BALB/c

Para poder evaluar la capacidad inmunogénica del baculovirus Ac-GPC se utilizaron BV purificados parcialmente del sobrenadante de células High Five™ infectadas. Se inocularon 8 animales BALB/c por vía subcutánea con el baculovirus Ac-GPC o el baculovirus control Ac-DsRed de modo tal de inyectar a cada animal con un total de 10^8 partículas virales. Cada 14 días se repitieron las inoculaciones y se extrajo muestra de suero de cada ratón. Finalmente, 14 días luego de la tercera inoculación los animales se sacrificaron y se tomó la mayor cantidad posible de suero. La Figura II.15 corresponde a un análisis de la reactividad de los sueros obtenidos mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando como anticuerpos primarios *pools* de aquellos sueros extraídos de cada uno de los grupos experimentales sobre un cultivo en monocapa de células A549 infectadas con JUNV que expresa en su superficie la proteína GPC. En la misma puede observarse reacción positiva para el *pool* de sueros de los animales inoculados con el baculovirus Ac-GPC.

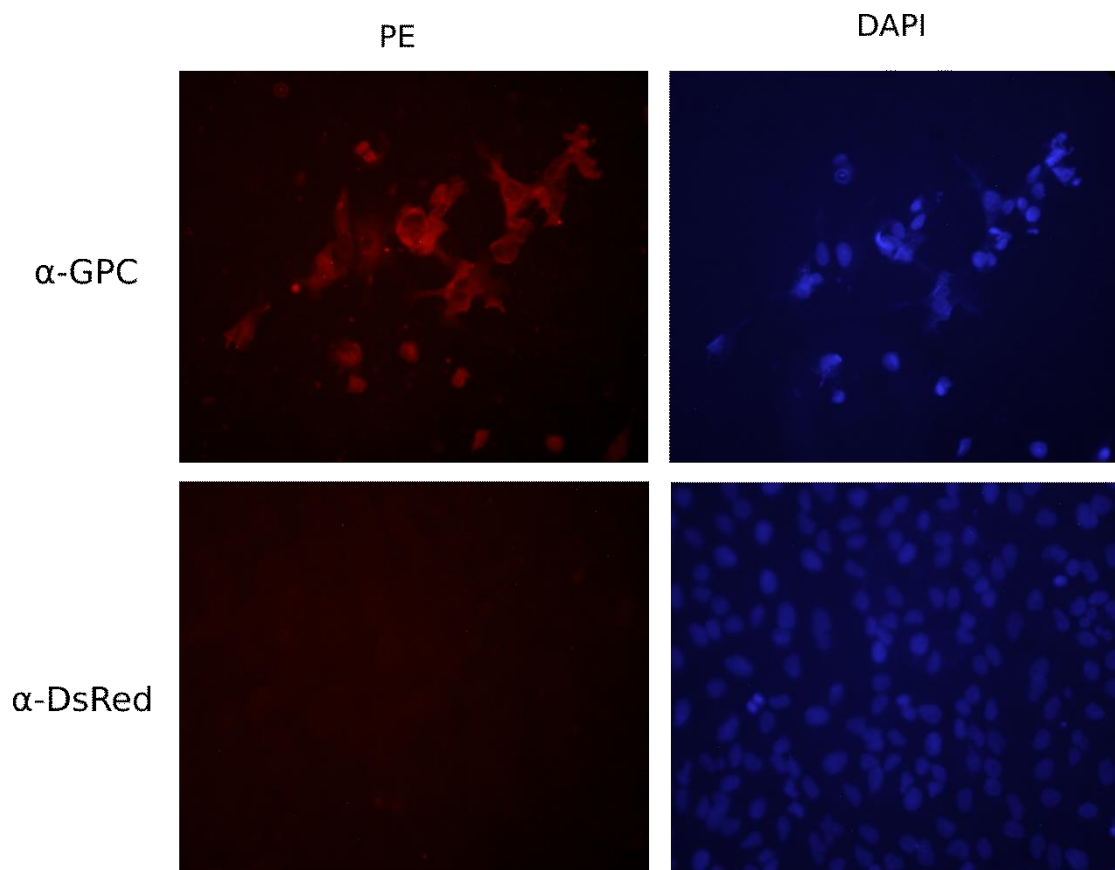


Figura II. 15 Inmunofluorescencia sobre células humanas A549 infectadas con JUNV desafiadas con *pools* de los sueros de los animales inoculados con los baculovirus Ac-GPC (paneles superiores α-GPC) y Ac-DsRed (paneles inferiores α-DsRed). La reactividad de los sueros fue evidenciada con el anticuerpo secundario anti-ratón ficoeritrina (PE).

Discusión

Las glicoproteínas de superficie derivadas de GPC de JUNV son las proteínas responsables de la interacción de la partícula viral con la célula hospedadora y de mediar el ingreso a la misma [111]. El desarrollo de alternativas vacunales seguras que apunten a generar inmunidad específica contra dicha proteína resulta de gran interés, en primer lugar, porque tendrían muchas posibilidades de generar anticuerpos neutralizantes que impidan el ingreso del virus a la célula hospedadora y, en segundo lugar, porque sortearían los riesgos y limitaciones de la vacuna actual a virus atenuado.

En esta sección del presente trabajo doctoral, se abordó la expresión de GPC en el sistema de células de insecto mediada por baculovirus. En ese contexto, se generó un recBV capaz de expresar en cultivo celular de insecto la glicoproteína del JUNV incorporando las glicosilaciones correctas, pero con procesamiento incompleto al no observarse clivaje entre las subunidades G1 y G2. Esto resultó esperable, ya que los insectos no cuentan con la proteasa SKI-1/S1P responsable de dicho procesamiento [104].

Sin embargo, resultó un hallazgo muy interesante que el péptido señal de GPC, SSP, fuera reconocido como tal en el sistema de expresión de células de insecto, direccionando la proteína a la vía de síntesis de glicoproteínas y a la membrana plasmática celular.

La localización superficial de GPC en células Sf9 y High Five™ pudo ser aprovechada para el desarrollo de herramientas para la detección de anticuerpos específicos y podría ser útil para la selección de sueros para el tratamiento de la FHA así como para el diagnóstico etiológico de la enfermedad. Tal como se demostró en este capítulo, la metodología de inmunofluorescencia acoplada a microscopía de epifluorescencia o microscopía confocal, utilizando células de insecto infectadas con el baculovirus generado como soporte, permite la identificación de sueros reactivos de pacientes convalecientes. Además, la utilización de un sistema libre de JUNV para la identificación de plasmas y sueros disminuye los requisitos en materia de bioseguridad y este u otros ensayos derivados podrían realizarse en centros de salud y diagnóstico de menor complejidad.

Como alternativa, se desarrolló un ELISA para cubrir dichos objetivos permitiendo el procesamiento en simultáneo de múltiples muestras. Los resultados obtenidos muestran que este ensayo es comparable al de referencia desarrollado en el INEVH [124, 125] y podría ser utilizado no sólo para el diagnóstico de la enfermedad sino también para la selección de plasmas inmunes para el tratamiento de la misma. Al comparar los resultados obtenidos con los descriptos en la publicación de Ure y colaboradores encontramos que este ELISA guarda una correlación mayor con el ELISA realizado por el INEVH y su ensayo de neutralización y reducción de placas, pero posee una sensibilidad menor al ELISA que utiliza la proteína N recombinante como *coating* [114].

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína recombinante, aprovechando su localización superficial, se realizaron ensayos en ratones BALB/c utilizando como antígeno particulado células Sf9 infectadas con el baculovirus Ac-GPC. La obtención de anticuerpos IgG específicos contra el virus JUNV a los 45 días del tratamiento constituye un fuerte indicio de que podría constituirse un candidato vacunal efectivo a través de este sistema.

Finalmente, se demostró de forma indirecta que el virus recombinante Ac-GPC sería capaz de incluir en su envoltura lipídica la glicoproteína heteróloga GPC durante el proceso de brotación, convirtiéndolo en un posible candidato vacunal en sí mismo. Al incubar células Vero con partículas de BV de Ac-GPC es esperable que ocurran dos procesos diferentes. En primera medida, el baculovirus ingresaría a las células de mamífero por endocitosis mediada por su glicoproteína GP64 [66, 76]. En contraste, también existirán partículas virales que fusionen sus membranas a la membrana de la célula de forma inespecífica dejando la superficie celular decorada con las proteínas de la envoltura viral. El ensayo de citometría de flujo realizado con células Vero pre-incubadas con el baculovirus Ac-GPC tuvo como objetivo observar si la proteína GPC se localizaba en la superficie de las células Vero a través de este último fenómeno. En concordancia con estos resultados, la inoculación de ratones BALB/c con BV de Ac-GPC se pudo observar que este virus recombinante indujo una respuesta de anticuerpos específicos.

Es necesaria la realización de ensayos en modelos animales y posteriores desafíos con la cepa virulenta de JUNV utilizando este baculovirus como vector de inmunización en el corto y mediano plazo para poder continuar caracterizando este candidato vacunal que hasta este momento se muestra prometedor para la prevención de la FHA.

Capítulo III

Baculovirus *display* y transducción de genes contra la FHA

Introducción

Como se ha mencionado en el capítulo I, actualmente existen numerosas estrategias para la exposición de péptidos o proteínas heterólogas en la superficie de los baculovirus a través de la fusión traduccional de las mismas a la glicoproteína mayoritaria de los BV, GP64 [37]. Por lo general estas estrategias incluyen una copia adicional del gen *gp64* de modo tal que los viriones recombinantes incorporen en su envoltura tanto la proteína *wild type* como la proteína quimérica y conserven su infectividad. Además, se ha probado que los baculovirus que exponen en su superficie proteínas heterólogas son inmunógenos efectivos capaces de inducir una respuesta humoral específica contra dichas proteínas [32].

Esto se debe principalmente a que los baculovirus son capaces de generar una respuesta innata robusta a través de la activación de las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) [126].

En este capítulo se presentarán los resultados obtenidos para la generación de un sistema para la obtención de recBV que permita la incorporación de proteínas quiméricas constituidas por una copia adicional de GP64 y antígenos de interés. Para evaluar este tipo de vector, en nuestro laboratorio se utilizó como modelo de estudio la proteína de superficie G1 de JUNV.

Las glicoproteínas de JUNV son sintetizadas en forma de un precursor denominado GPC que luego es procesado por la proteasa celular SKI-1/S1P y la peptidasa señal para dar lugar al SSP, G1 y G2 que conjuntamente forman homotrímeros denominados espículas (Figura III.1.a y Figura II.2).

En la partícula viral de JUNV, G1 se localiza en la parte externa de las espículas proteicas que median la interacción del virus con receptores en la superficie de la célula hospedadora. Si bien actualmente la proteína G1 de JUNV no se encuentra cristalizada y por ende no se conoce su estructura exacta ni las diferentes conformaciones que adopta al interaccionar con el receptor celular, sí se conoce la estructura y las diferentes conformaciones de interacción de la proteína G1 del virus Machupo (MACV), un arenavirus estrechamente relacionado con JUNV [127, 128].

La interacción específica del virus con las moléculas receptoras en la membrana celular es un paso crucial en el proceso infeccioso dado que impulsa la posterior entrada en la célula. La expresión de los receptores celulares específicos constituye uno de los principales determinantes del tropismo, rango de hospedador y la patogénesis viral [129]. Hasta el año 2005, se sabía poco sobre el mecanismo de ingreso de JUNV a las células hospedadoras. Mediante el uso de retrovirus pseudotipados varios laboratorios confirmaron que JUNV, así como otros arenavirus del nuevo mundo, no interactúa con el receptor α -dístroglicano (receptor utilizado por los arenavirus del Viejo Mundo [130, 131]. Un año más tarde, utilizando técnicas de proteómica, pudo identificarse al receptor de la transferrina (TfR1) como el receptor utilizado por JUNV, MACV, y los virus Guanarito (GTOV) y Sabiá (SABV) [106]. Los autores también mostraron que la expresión de TfR1 humano, pero no de TfR2, condujo a una mayor susceptibilidad de líneas celulares de hámster resistentes a pseudotipos de JUNV, MACV, GTOV y SABV, pero no a arenavirus del viejo mundo. Además, la infección de células humanas con JUNV, MACV, GTOV y SABV pudo bloquearse de manera eficiente con anticuerpos anti-TfR1 [132]. Las proteínas G1 de los arenavirus del nuevo mundo poseen un total de 10 sitios potenciales de N-glicosilación que pueden incorporar oligosacáridos que decoran los bucles más expuestos. Dos sitios adicionales están completamente conservados entre todos estos virus y un tercer sitio se encuentra conservado sólo entre MACV y JUNV. Se cree que la estructura de la región que contiene los residuos glicosilables probablemente sea mucho más variable que la estructura que contiene los residuos implicados en la unión al receptor, así como aquellos que participan en la interacción con G2. Estos últimos aminoácidos se encuentran fuera de esta región y son ampliamente conservados [128].

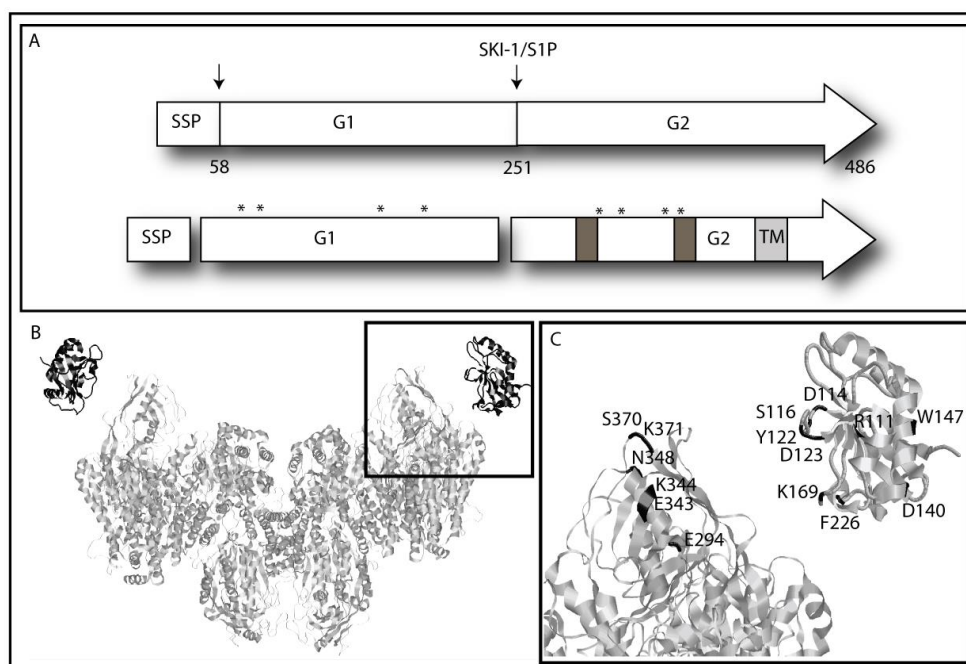


Figura III. 1 a. Representación esquemática de la poliproteína GPC con sus sitios de clivaje proteolítico (indicados con flechas). Los asteriscos muestran los sitios de glicosilación y en la proteína G2 se encuentran resaltados los dominios fusogénicos y transmembrana (TM). b. Esquema de la interacción del receptor de la transferrina humana (hTfR1) con la glicoproteína G1 de MACV realizado con los modelos a partir del archivo pdb disponible en la base de datos. c. Detalle de los aminoácidos involucrados en dicha interacción [91].

El ciclo replicativo de JUNV comienza con la interacción de G1 con el receptor de la transferrina humana (hTfR1) de la célula hospedadora (Figura III.1.b y c). Si bien hTfR1 es considerado como el principal receptor involucrado, existen indicios de que JUNV puede utilizar los receptores DC-SIGN y L-SIGN en vías alternativas de infección [133].

Mientras G1 interacciona con el TfR1, G2 es responsable del proceso de fusión. Las principales características del modelo actual para la proteína G2 incluyen un extremo N-terminal hidrofóbico y dos hélices antiparalelas separadas por una región de bucle glicosilada. El pH bajo genera una serie de reordenamientos que conducen a la fusión de las membranas. Estudios similares revelaron que el SSP también desempeña un papel crucial en la fusión. Diferentes sustituciones de aminoácidos en el SSP afectan significativamente la capacidad de GPC para mediar la fusión de las membranas [108, 134].

La vacuna atenuada de JUNV, Candid #1, ha demostrado su eficacia durante las dos últimas décadas en más de 500.000 personas (revisado en [84, 135]). Esta vacuna ha sido producida recientemente en Argentina y probada en un estudio

clínico con 946 voluntarios sanos [136]. Los resultados presentados por Enria y colaboradores (2010) [136] demostraron que la vacuna producida en Argentina es equivalente a la fabricada en EE.UU., tanto en la capacidad inmunogénica como en la ausencia de efectos adversos graves. Candid #1 es la primera vacuna eficaz contra arenavirus; es capaz de proteger contra la insuficiencia cardíaca aguda causada por JUNV, promover una respuesta tanto humoral como celular y, desde enero de 2007, en Argentina es parte del Programa Nacional de Vacunación en el área de riesgo [136]. Si bien la vacuna Candid #1 se utiliza en personas a partir de los 15 años de edad y la respuesta inmune humoral generada persiste durante años, dada su naturaleza de vacuna a virus atenuado existen limitaciones para su aplicación en infantes, personas inmunodeprimidas y pacientes inmunocomprometidos como diabéticos y embarazadas. Por este motivo, resulta de particular interés el desarrollo de vectores vacunales que presenten un mayor nivel de bioseguridad aptos para esta población de riesgo.

Objetivos específicos

1. Diseño y construcción de un plásmido de transferencia para la expresión de proteínas quiméricas constituídas por porciones de GP64 y diferentes antígenos de interés y su exposición en la superficie de partículas virales brotantes (BV) de AcMNPV.
2. Amplificación de diferentes secuencias comprendidas dentro del marco abierto de lectura (ORF) correspondiente a la glicoproteína de la superficie G1 de JUNV.
3. Clonado de las secuencias amplificadas y generación de los baculovirus AcMNPV recombinantes con GP64 quimérica.
4. Detección de la proteína de fusión en células infectadas.
5. Modificación del vector pBacPAK9 para generar recBV con capacidad transductora en células de mamífero que expresen la proteína GPC.
6. Detección de las proteínas recombinantes en los recBV obtenidos e inoculación del modelo animal.
7. Evaluación de la respuesta inmune (celular y humoral) generada por los vectores baculovirales desarrollados.

Materiales y métodos

Construcción del vector de transferencia pBacDis para la exposición superficial de antígenos.

Inicialmente, se amplificó el gen completo de *gp64* por PCR empleando los *primers* específicos *gp64Fw* y *gp64Rv* (Tabla VI.1 en capítulo VI). Posteriormente, se clonó el producto de amplificación obtenido en el vector pCR4-TOPO de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego, se procedió a modificar el gen *gp64* mediante mutagénesis por PCR de acuerdo al esquema mostrado en la Figura III.2.a empleando los *primers* *Ins1Fw*, *Ins1Rv*, *Ins2Fw* e *Ins2Rv* con el objetivo de incorporar sitios de clonado en las regiones indicadas. A continuación, se digirieron los fragmentos con *KpnI*, se ligaron utilizando la ligasa del fago T4 y se transformó el producto de ligación en bacterias Top10 electrocompetentes.

Con el objetivo de desarrollar un sistema rápido y versátil para la obtención de recBV, se utilizó como material de partida el vector de transferencia pBacPAK9 del sistema de recombinación bAcGOZA [137]. Se clonó el gen modificado de *gp64* en dicho vector de transferencia utilizando los sitios *EcoRV* y *SacI*. El vector de transferencia resultante fue denominado pBacDis. Las condiciones de digestión y ligación con la ligasa del fago T4 obedecieron a las proporcionadas por el fabricante y se detallan en el capítulo VI de materiales y métodos generales.

Determinación del posible péptido de interacción de G1 con hTFR1

Debido a que se han publicado trabajos en los que se ha demostrado una baja eficiencia en la incorporación de proteínas quiméricas en la superficie de los viriones brotantes cuando la secuencia adicionada a *gp64* supera los 500 pb, se realizó un análisis bioinformático para identificar un tramo pequeño de G1 con características relevantes. Para ello, se apuntó a la predicción de secuencia de aminoácidos con los sitios de interacción de G1 de JUNV con su receptor y utilizar ese fragmento insertado en GP64 como posible inmunógeno (Figura III.3.a). Se realizó un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las glicoproteínas del virus Machupo (MACV) y el virus Junín (JUNV) con el programa AlignX y se localizaron los dominios de interacción descriptos para MACV [128, 138].

Posteriormente, se amplificó por PCR obteniendo el fragmento de 120 pb (G1PD) predicho *in silico* con los *primers* específicos *g1pdFw* y *g1pdRv*.

Clonado de diferentes secuencias de G1 y de EGFP en pBacDis

Se amplificó por PCR la secuencia completa de la glicoproteína G1 de JUNV empleando los *primers* específicos *g1Fw* y *g1Rv* que contienen en los extremos el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI*. La secuencia amplificada no incluye el péptido señal ni un codón de terminación. Posteriormente, la secuencia fue clonada en el vector pBacDis en el sitio *EcoRI* en fase con la secuencia codificante de *gp64*.

La misma metodología fue utilizada con el péptido G1PD y con la proteína verde fluorescente EGFP. Esta última construcción se realizó con los *primers* específicos *egfpFw* y *egfpRv*.

Obtención de los baculovirus recombinantes Ac-G1Dis, Ac-G1PDis, Ac-EGFPDis, Ac-ie1DsRed y Ac-ie1GPC

Se utilizó el sistema desarrollado por Je *et al.* (2001, 2003), basado en un bácmido (genoma viral capaz de replicar en *E. coli*, denominado bAcGOZA) deficiente en el gen esencial *ORF1629* y el rescate de DNA viral viable por recombinación con un plásmido de transferencia que contiene ese gen junto con otros que se desea expresar [123], [122]. Para ello, se cotransfectó 1 µg del DNA del plásmido de transferencia y 1 µg del DNA del bácmido en células Sf9 utilizando el reactivo *Cellfectin II* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. (Figura II.3).

Expresión de las proteínas GP64-G1 y GP64-G1PD

Las proteínas fueron visualizadas mediante SDS-PAGE (10% acrilamida) y tinción de los geles con *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25% p/v [Sambrook *et al.*, 1989]. Para la realización de los ensayos de *Western Blot*, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF (HybondTM-P; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) durante 30 minutos a una diferencia de potencial de 15 V utilizando el sistema semi-seco en un equipo Trans-blot1 SD (BioRad, Hercules, CA).

La membrana fue bloqueada con una solución de 5% de leche descremada en PBS-0,1% Tween20 durante una hora a 37°C. A continuación, se realizó la

incubación con el anticuerpo primario, utilizando en algunos casos plasmas inmunes policlonales provenientes de pacientes convalecientes y en otros casos anticuerpos monoclonales anti-GPC GB06-AE05 [Sanchez et al., 1989] y anti-GP64. En todos los casos se utilizó una dilución 1:400 y la incubación se realizó durante 2 horas a 37°C.

Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado en caso de haber utilizado el anticuerpo monoclonal como anticuerpo primario, o anti-humano biotinilado en caso de haber utilizado plasma inmune de pacientes previamente. En ambos casos se utilizó una dilución 1:500 y la incubación se desarrolló durante 1 hora a 37°C. Luego, se realizó la incubación con estreptavidina conjugada a la enzima HRP (Peroxidasa de rábano) en una dilución 1:1000 durante 1 hora a 37°C. Luego de cada incubación, la membrana fue lavada tres veces con PBS-0,1% Tween20 durante 15 minutos. Finalmente se procedió al revelado incubando la membrana con una solución constituida por 1.25 mM luminol (Sigma, St. Louis, MO), 200mM ácido p-cumárico (Sigma) y 2.7 mM H₂O₂ en 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5. Las imágenes fueron obtenidas con el adquisidor EC3TM 500 (UVP, Upland, CA).

Inoculación de células Sf9 infectadas en ratones BALB/c

Se infectaron células Sf9 con los diferentes recBV (Ac-G1Dis, Ac-G1PD, Ac-DsRed) y luego de 72 hs se resuspendieron las células en PBS y se inocularon hembras BALB/c de 7 semanas de edad con 100 µl de suspensión celular (10⁷ células) por vía subcutánea. Se inocularon en total 16 animales repartidos en 4 grupos de 4 animales cada uno.

Grupo 1: Ac-G1Dis; Grupo2: AcG1PD; Grupo3: Ac-DsRed (Control -) Grupo4: Candid#1 (cepa vacunal de JUNV, control +).

Antes de cada inoculación se tomaron muestras de sangre de cada animal y se realizaron re-inoculaciones cada 15 días.

Ensayo de inoculación de BV en ratones BALB/c

Se utilizaron inóculos de viriones brotantes parcialmente purificados. Se inocularon 12 hembras BALB/c en total de 6 semanas de edad por vía subcutánea con el baculovirus Ac-G1dis, Ac-G1PD o el baculovirus control Ac-DsRed de modo tal de inyectar a cada animal con un total de 10⁸ partículas virales. Cada 14 días se repitieron las inoculaciones y se extrajo una muestra de

sangre de cada ratón. Finalmente, 14 días después de la tercera inoculación se los animales se sacrificaron y se extrajo la mayor cantidad posible de sangre. La sangre se dejó coagular durante la noche a 4°C y para obtener el suero.

A continuación, se realizaron *pooles* con los sueros correspondientes al mismo grupo experimental. Se utilizó una dilución 1/50 de los sueros para realizar un ensayo de inmunofluorescencia sobre una monocapa de células A549 infectadas con JUNV.

Construcción del vector de transferencia pBacPAK9-ie1GPC para la transducción de células de mamífero.

Se amplificó por PCR la secuencia correspondiente al promotor del gen *ie1* de citomegalovirus (CMV) a partir de una preparación plasmídica del plásmido comercial pDsRedN3 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, EE.UU.) utilizando los *primers* específicos *promie1Fw* y *promie1Rv* incorporando en su secuencia los sitios de reconocimiento para la enzima *Bam*HI y *Bgl*II, respectivamente. El producto de amplificación fue subclonado en el vector pGemT-easy y luego en el vector pBacPAK9-GPC (descrito en el capítulo II) en el sitio *Bam*HI, reemplazando al promotor de poliedrina original en dicho vector.

Expresión de GPC en células Vero medida por citometría de flujo

Para poder analizar si el baculovirus Ac-ie1GPC es capaz de inducir la expresión de dicha proteína en células de mamífero se realizó un ensayo de transducción incubando una monocapa de células Vero al 60% de confluencia con el recBV durante una hora a 37°C a una MOI de 10. Luego del transcurso de 24 o 48 hs luego de la transducción las células fueron analizadas por citometría de flujo marcando específicamente la proteína GPC en la superficie con el anticuerpo monoclonal GB06-AE05 y luego con un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC. Las células marcadas fueron procesadas en el citómetro de flujo FACSCalibur 255 provisto por la Academia Nacional de Medicina.

Preparación de los inóculos de viriones brotantes

Se infectaron células High Five™ con los diferentes recBV y luego de 72 hs se colectó el sobrenadante. Se centrifugaron los viriones brotantes a 14.000 rpm durante 40 minutos y fueron resuspendidos en PBS.

Ensayo de transducción *in vivo* en BALB/c con BV

Un total de 8 ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad fueron inoculados por vía intraperitoneal con 10^8 partículas virales del recBV Ac-*ie1*GPC o del control Ac-*ie1*DsRed. Luego de 14 días, los animales se sacrificaron y se tomaron muestras de sangre y de bazo.

Cultivo de esplenocitos y ensayo de inmunidad celular

Para el aislamiento de esplenocitos, en condiciones de esterilidad, se colectaron los bazos de los animales al finalizar el experimento (14 dpi) en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (RPMI-10). Los esplenocitos se extrajeron presionando los bazos contra una malla metálica sobre una caja de Petri con 1-2 ml de medio RPMI-10. Luego, la suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 ml y se llevó a 4 ml con el mismo medio. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C y se resuspendieron en 4 ml de NH_4Cl 0,1 M para lisar los glóbulos rojos. La suspensión se mezcló con vortex unos segundos, se incubó en hielo durante 3-4 min, se completó con 10 ml de medio RPMI-10 y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C. El sobrenadante se descartó y el procedimiento se repitió para asegurar la lisis completa de los eritrocitos. Finalmente, las células se lavaron con el medio RPMI-10, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C y se resuspendieron en 500 μl del mismo medio. El recuento de los esplenocitos vivos se realizó en una cámara de Neubauer utilizando el colorante azul tripán, el cual ingresa sólo en las células no viables, dejando a las viables incoloras. Se realizaron suspensiones con una concentración de 10^7 células en 2 ml de medio RPMI-10, las cuales fueron pre-estimuladas con 4×10^6 PFU de JUNV inactivado previamente con radiación UV. Luego de incubar las células 2 hs a 37 °C con 5% CO_2 , se enfrentaron los esplenocitos provenientes de los diferentes grupos experimentales con monocapas de células humanas A549 transducidas con el baculovirus Ac-*ie1*GPC o con el baculovirus Ac-*ie1*DsRed. Los niveles de apoptosis en la monocapa celular de A549 inducida por los esplenocitos se midieron mediante la técnica de TUNEL luego de las 8 y 16 hs posteriores al inicio de la incubación con los esplenocitos pre-estimulados.

Determinación microscópica de la fragmentación del DNA (Método de TUNEL)

Las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas con 4 % de paraformaldehído en PBS durante 10 min. y permeabilizadas mediante irradiación por microondas (370 W, 5 min.) en buffer citrato 10 mM pH 6. Los puntos de ruptura de las cadenas de DNA fueron marcados con dUTP derivatizado con digoxigenina (DIG), utilizando desoxinucleotidiltransferasa terminal (0.18 U/ μ l) de acuerdo al protocolo del fabricante. Luego de una incubación con 10 % de suero normal de burro en PBS por 40 min., las células fueron incubadas por 1 h. con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con FITC (1:10) para detectar la incorporación de nucleótidos a los extremos 3'-OH del DNA fragmentado. Finalmente, las células fueron montadas y visualizadas por microscopía de fluorescencia.

Resultados

Construcción del vector pBacDis

Se amplificó por PCR el gen completo *gp64* incluyendo su propio promotor y su señal de poliadenilación. Posteriormente, se clonó el producto de PCR en el vector pCR-TopoTA obteniéndose 18 clones positivos. La secuencia clonada fue confirmada por secuenciación. A continuación, de acuerdo al esquema presentado en la Figura III.2.a, se realizaron las reacciones de amplificación correspondientes para incorporar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción necesarios para el objetivo planteado. La Figura III.2.b muestra la corrida electroforética de ambos productos de amplificación.

Luego de la transformación pertinente, se obtuvieron 10 clones positivos. Finalmente, se liberó el gen *gp64* modificado por digestión con las enzimas *EcoRV* y *SacI* y se clonó el mismo en el vector de transferencia pBacPAK9. La Figura III.2.c muestra un esquema del nuevo vector de transferencia generado pBacDis y de la confirmación por PCR del clonado descrito anteriormente. La generación del vector fue confirmada por digestión (Figura III.2.d) y por secuenciación (Figura III.2.e).

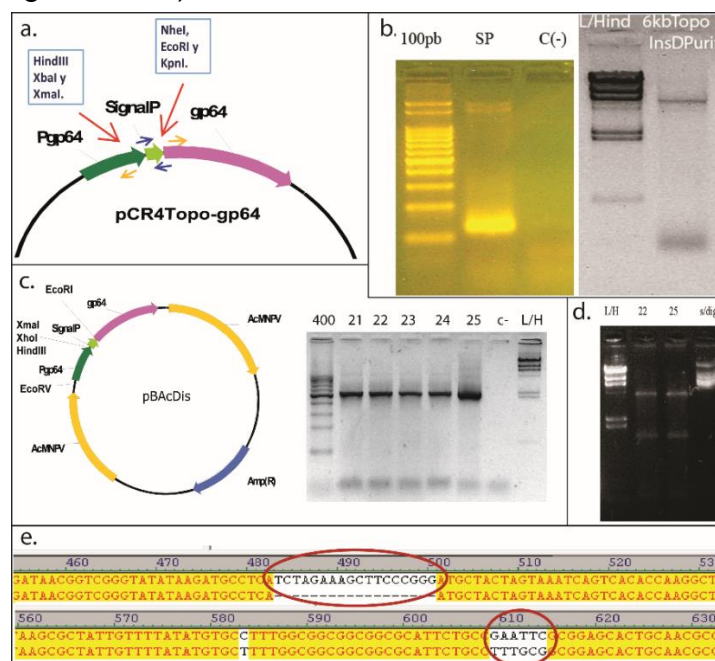


Figura III. 2 Generación del vector de transferencia pBacDis para la exposición superficial de antígenos. a. Esquema de la modificación por PCR del gen de *gp64*. b. Amplificación de los fragmentos de 6 kpb y 120 pb. c. Esquema del vector pBacDis y *screening* por PCR del clonado del gen de *gp64* modificado en pBacPAK9. d. Clones positivos confirmados por digestión con *EcoRV* y *EcoRI*. e. Alineamiento de las secuencias del clon 22 con la secuencia teórica de *gp64* original, las secuencias remarcadas con óvalos rojos representan las incorporaciones realizadas por PCR.

Clonado de diferentes secuencias de G1 y de EGFP en pBacDis

El alineamiento entre la secuencia codificante para la glicoproteína G1 de JUNV y la secuencia codificante para la glicoproteína G1 de MACV se muestra en la Figura III.3.a.

En el mismo pudieron localizarse 4 de los 5 dominios de interacción con el receptor de la transferrina humana (hTfR) caracterizados previamente para la proteína del virus Machupo [138]. A partir del análisis *in silico* se pudo identificar un péptido de 28 aminoácidos cuya secuencia contiene los motivos de interacción 1, 2, 4 y 5.

Con *primers* específicos se amplificó la secuencia del péptido identificado mediante el análisis bioinformático (G1PD) y la secuencia completa de la proteína G1 (excluyendo su péptido señal y sin incorporar un codón de terminación) utilizando como molde la secuencia codificante para el precursor GPC de JUNV (Figura III.3.b y c). Todos los productos de PCR fueron clonados en el vector pGemT-easy.

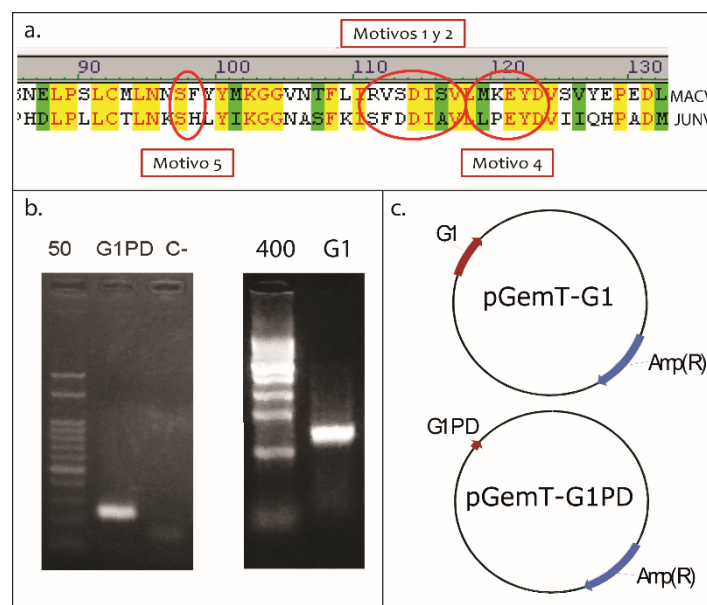


Figura III. 3 a. Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas G1 de MACV y JUNV. En rojo se encuentran señalados los motivos de interacción entre G1 de MACV y el receptor hTfR1 (Radoshtzky 2011) que fueron incluidos al amplificar el péptido denominado G1PD. b y c. Amplificación y clonado en el vector pGemT de las secuencias codificantes para la proteína G1 completa y el péptido G1PD

Posteriormente, utilizando los sitios de *EcoRI* incorporados durante la amplificación por PCR, se clonaron las secuencias de G1PD y G1 en el vector pBacDis de modo tal de que cada una de ellas quedara fusionada

traduccionalmente a la proteína GP64. La Figura III.4 muestra un esquema de los vectores pBacDis-G1PD y pBacDis-G1 obtenidos y los resultados correspondientes al *screening* de los clones por PCR.

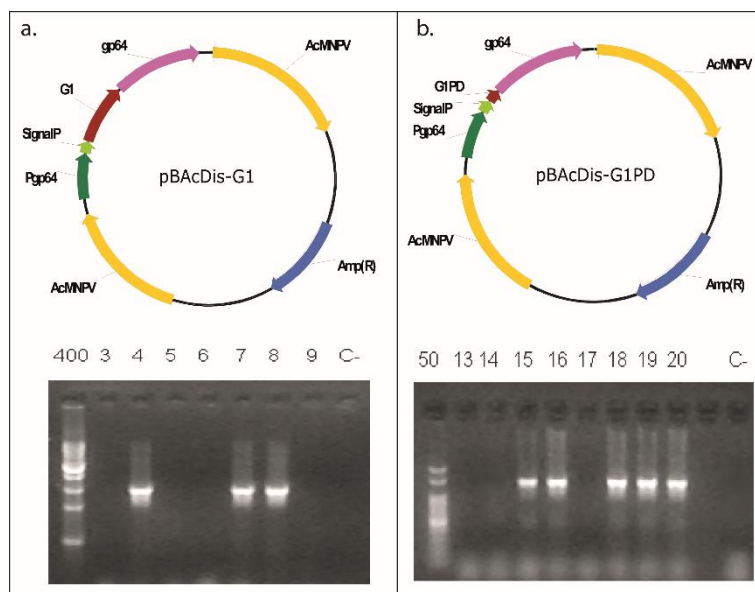


Figura III. 4 Clonado de las secuencias codificantes para G1 y G1PD en el vector de transferencia pBacDis. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de la secuencia de G1 (a) y de G1PD (b) durante un *screening* por *colony* PCR, obteniéndose 3 y 5 clones positivos, respectivamente.

El mismo procedimiento experimental se desarrolló para generar el vector pBacDis-EGFP. La Figura III.5 muestra el *screening* por PCR. Todas las construcciones obtenidas fueron confirmadas por secuenciación.

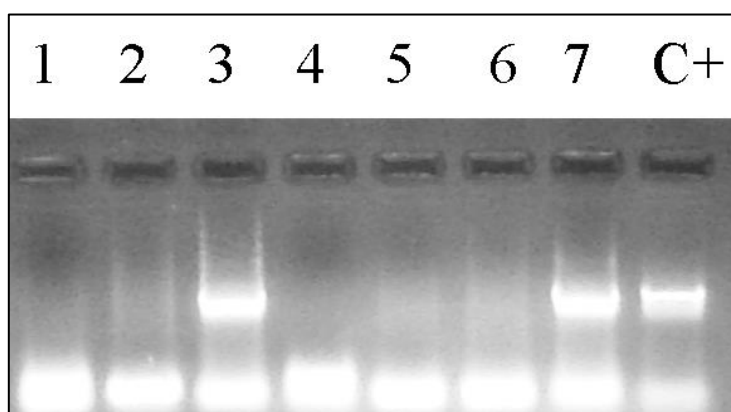


Figura III. 5 Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación correspondiente al ORF de eGFP durante un *screening* por *colony* PCR (calles 1-7). Se obtuvieron 2 clones positivos (calles 2 y 7). Como control positivo (C+) se utilizó una preparación del plásmido pEGFP-N3 diluída 1:1000.

Obtención de los baculovirus recombinantes Ac-G1Dis, Ac-G1PD y Ac-EGFPDis

Para obtener los recBV se co-transfectaron las diferentes construcciones previamente obtenidas con el bácmido bAcGOZA en células High Five™. La figura III.6.a muestra la obtención de poliedros 96 horas luego de haber realizado la transfección. En la figura III.6.b se puede observar la confirmación de la incorporación de las secuencias heterólogas en los tres casos mediante PCR utilizando como molde extracciones de DNA a partir de viriones brotantes (BV) en el sobrenadante del cultivo celular.

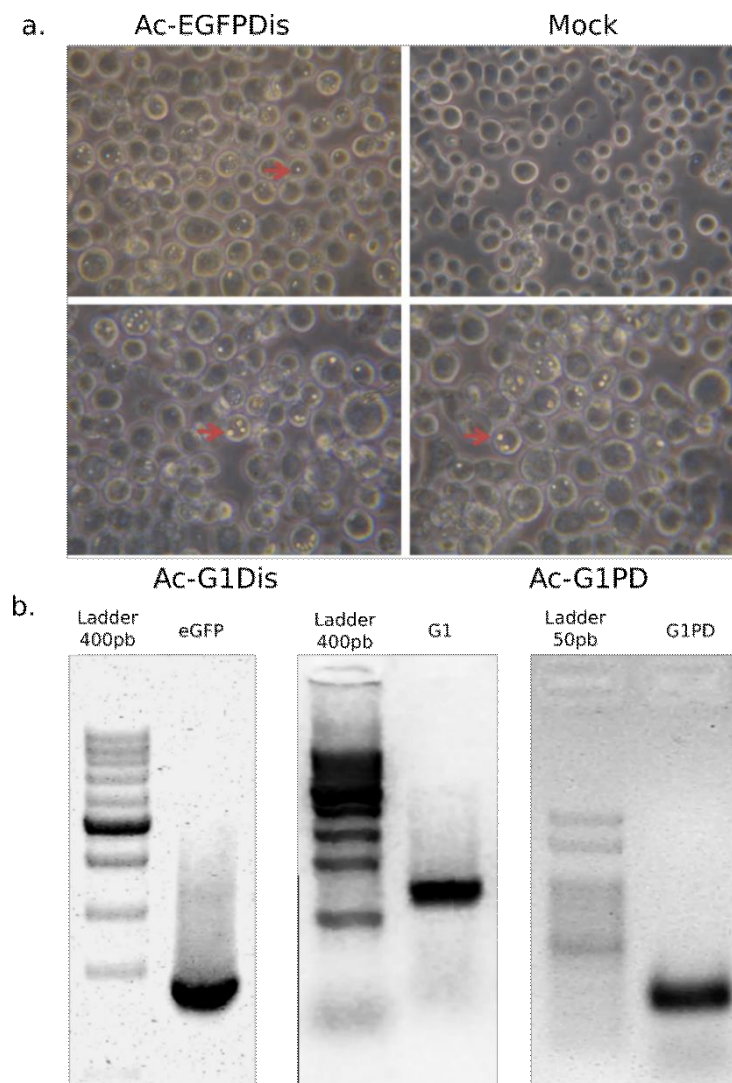


Figura III. 6 a. Microscopía óptica: aparición de poliedros en las células High Five™ co-transfectadas con el bácmido bAcGOZA y los plásmidos de transferencia. La aparición de poliedros en diferentes células vecinas es un indicio de la doble recombinación homóloga y producción de los baculovirus recombinantes Ac-EGFPDis, Ac-G1Dis y Ac-G1PD. b. Confirmación por PCR de la incorporación de las secuencias heterólogas en el genoma de los virus recombinantes utilizando como molde DNA genómico y los *primers egfpFW, egfpRv, g1Fw, g1Rv, g1pdFw y g1pdRv*.

Expresión de la proteína quimérica GP64-EGFP

Para poder determinar el correcto funcionamiento del sistema de expresión de proteínas en fusión traduccional con la copia adicional de GP64, se infectaron células Sf9 con el recBV Ac-EGFPDis. La figura III.7 muestra diferentes micrografías tomadas por microscopía confocal, observándose la fluorescencia correspondiente a la proteína EGFP de forma difusa en todas las células infectadas.

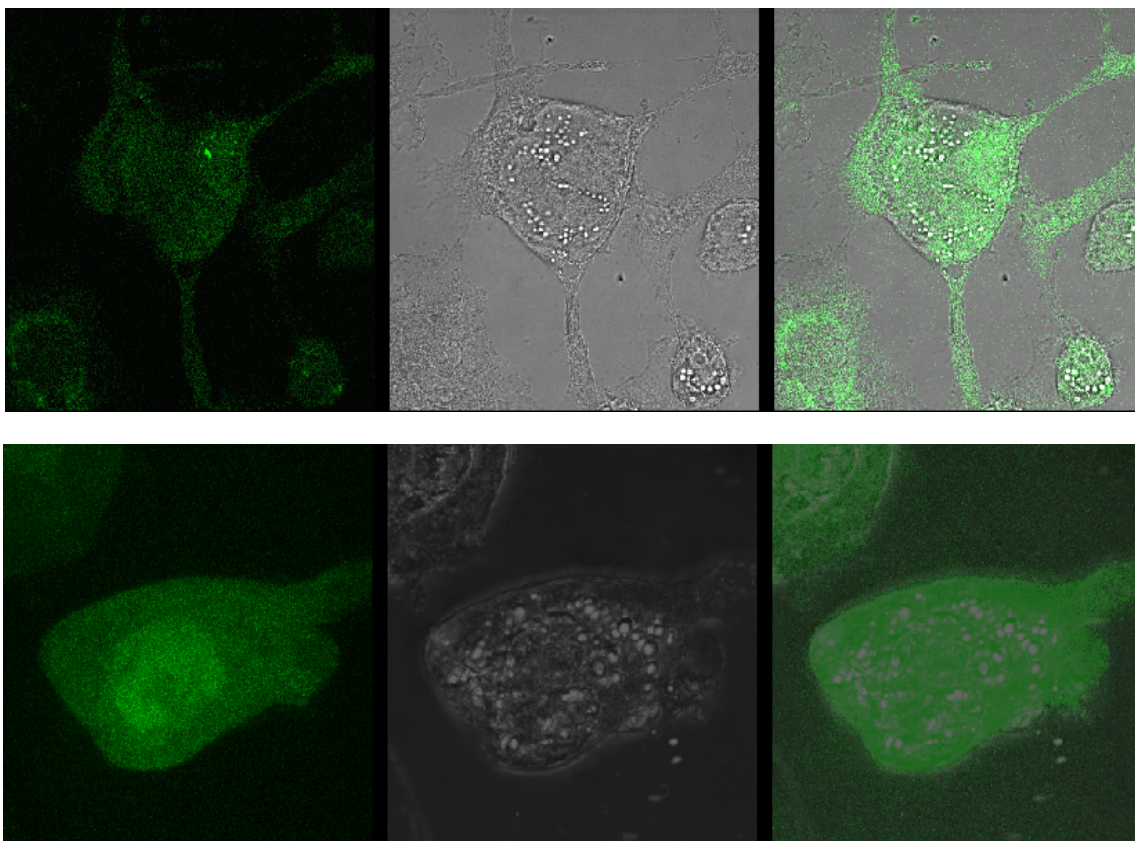


Figura III. 7 Microscopía confocal de células High FiveTM infectadas con el baculovirus recombinante Ac-EGFPDis. Fluorescencia verde de eGFP (izquierda), morfología celular en campo claro (medio) y superposición de ambas imágenes (derecha).

Expresión de la proteína quimérica GP64-G1

Una vez obtenido el recBV Ac-G1Dis y confirmada la incorporación de la secuencia de interés en su genoma, se procedió a identificar la expresión de la proteína quimérica GP64-G1. La figura III.8 muestra un *Western blot* realizado sobre un extracto celular infectado con un anticuerpo monoclonal anti-GP64. Cómo puede observarse en las calles donde se sembraron las proteínas provenientes de células High FiveTM infectadas con Ac-G1Dis se pueden

identificar dos bandas de diferente tamaño correspondientes a la proteína GP64 *wild type* y a la proteína de fusión GP64-G1.

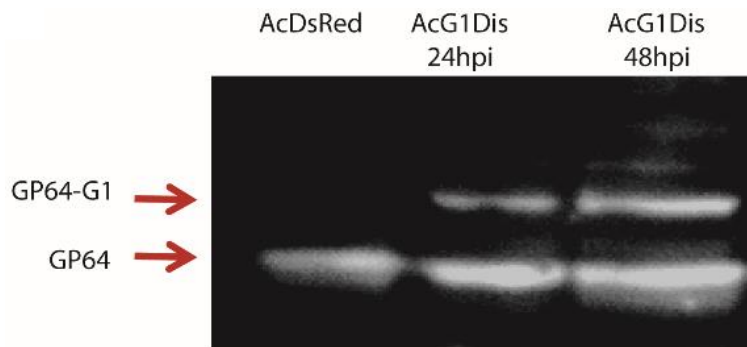


Figura III. 8 Western Blot de proteínas de lisados de células Sf9 infectadas con los baculovirus Ac-G1Dis y AcDsRed; revelado con un anticuerpo monoclonal anti-GP64. Las bandas correspondientes a las proteínas GP64 (67 kDa) y GP64-G1 (80 kDa) se encuentran indicadas con flechas.

Del mismo modo se intentó identificar la proteína GP64-G1PD pero no fue posible observar diferencias de tamaño con la proteína GP64 *wt.* mediante *Western Blot* empleando anticuerpos anti-GP64, ni se observó reactividad de la misma con sueros específicos de JUNV.

Ensayo de inoculación de células Sf9 infectadas en ratones BALB/c

Para evaluar la inmunogenicidad de las proteínas quiméricas GP64-G1 y GP64-G1PD expresadas en células de insecto se realizó inicialmente un ensayo *in vivo* utilizando como antígeno particulado células Sf9 infectadas con el baculovirus Ac-G1Dis, Ac-G1PD o Ac-DsRed.

Los resultados mostrados en la Figura III.9.a corresponden a los sueros obtenidos 15 días post-inoculación para cada uno de los tres grupos. Dichos sueros fueron analizados a través de un ELISA utilizando como *coating* células Vero infectadas con JUNV. Como puede observarse en los gráficos no existen diferencias significativas en la reactividad de los sueros obtenidos a partir de los tres grupos experimentales. Lo mismo sucedió a los 30 días post-inoculación (Figura III.9.b). La Figura III.9.c muestra la aparición de anticuerpos IgG específicos contra JUNV en todos los grupos en contraste con el grupo control inoculado con células infectadas con el baculovirus Ac-DsRed. Además, los sueros obtenidos y utilizados como fuente de anticuerpos primarios en este ELISA muestran una respuesta del tipo dependiente de la dosis. La figura III.9.d

muestra una comparación de todos los grupos experimentales 45 d.p.i. incluyendo al grupo de animales inoculados con Candid#1 (resultados mostrados en detalle en el capítulo II).

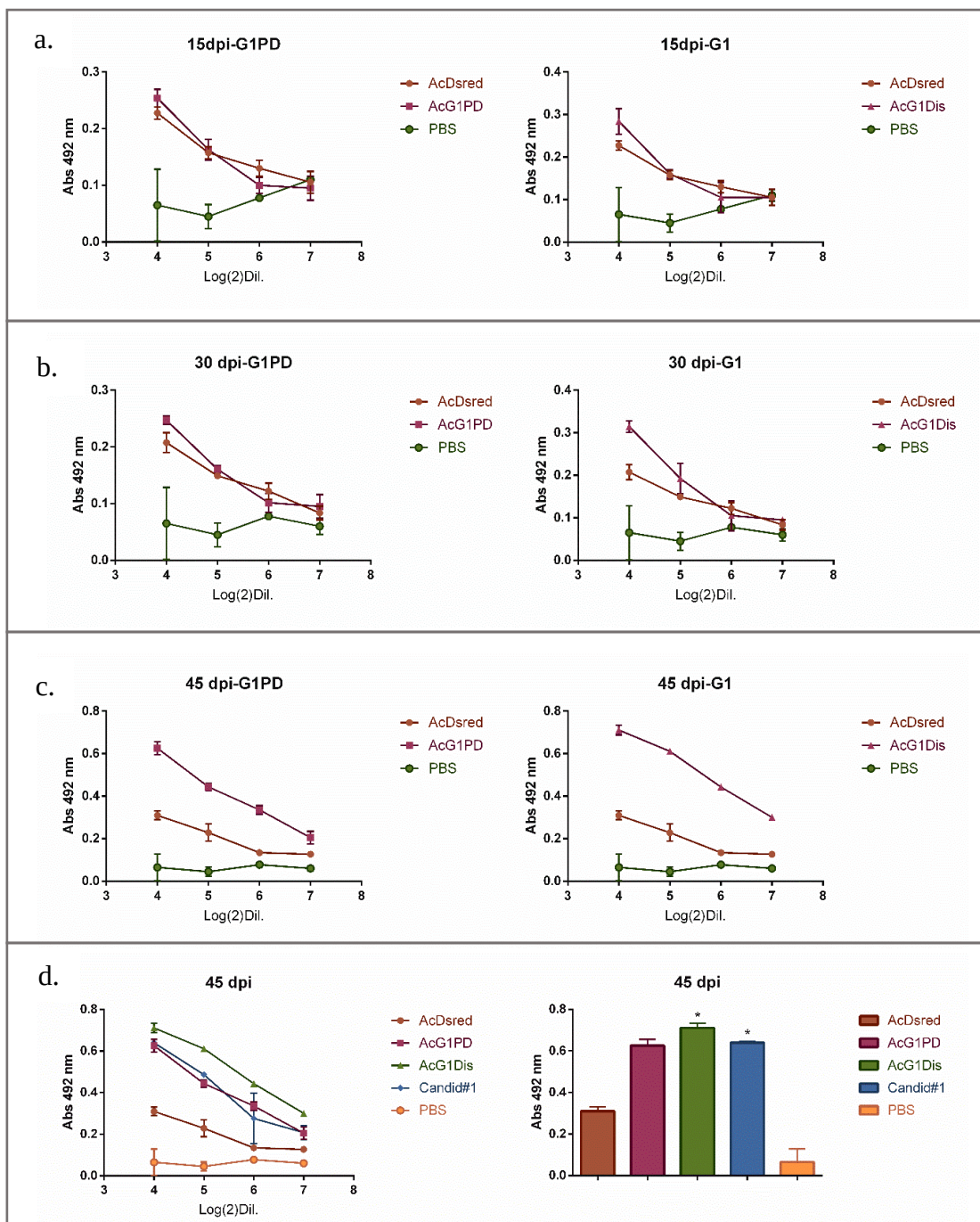


Figura III. 9 ELISA utilizando como *coating* células Vero infectadas con JUNV. Se evaluó la reactividad de los sueros extraídos de los ratones BALB/c pertenecientes a los cuatro grupos experimentales Sf9*Ac-DsRed, Sf9*Ac-G1Dis, Sf9*Ac-G1PD y Candid#1. Adicionalmente se utilizó como control PBS en lugar de anticuerpo primario. El ensayo se realizó utilizando los sueros extraídos a los 15 (a), 30 (b) y 45 días luego de la primera inoculación (c y d).

Ensayo *in vivo* en ratones BALB/c utilizando viriones brotantes como inóculo

Para poder evaluar la capacidad inmunogénica de los baculovirus Ac-G1Dis y Ac-G1PD se utilizaron como inóculo BV purificados parcialmente. Se inocularon un total de 12 animales BALB/c por vía subcutánea con el baculovirus Ac-G1, Ac-G1PD o el baculovirus control Ac-DsRed de modo tal de inyectar a cada animal con un total de 10^8 partículas virales. La figura III.10 corresponde a una inmunofluorescencia realizada utilizando como anticuerpos primarios *pools* de aquellos sueros obtenidos de cada grupo experimentales sobre un cultivo en monocapa de células A549 que expresa en su superficie la proteína GPC de JUNV. En la misma puede observarse reacción positiva para el *pool* de sueros de los animales inoculados con el baculovirus Ac-G1Dis y, en menor medida, en los inoculados con Ac-G1PD.

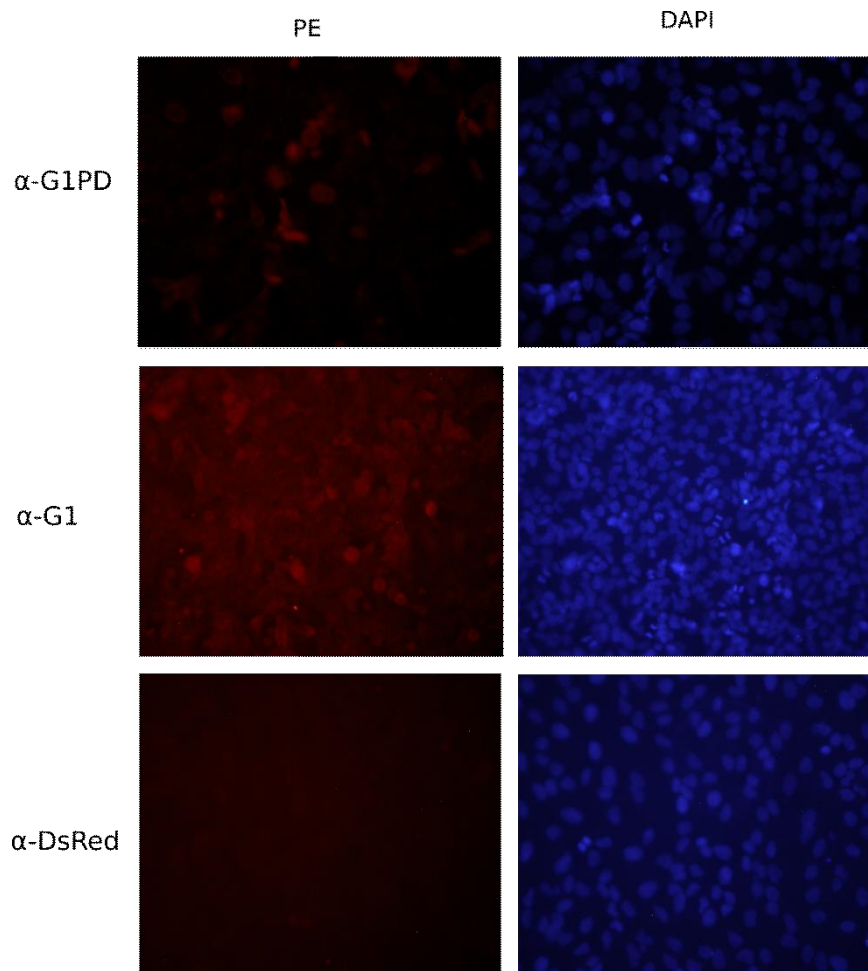


Figura III. 10 Inmunofluorescencia sobre células humanas A549 infectadas con JUNV incubadas con *pools* de los sueros de los animales inoculados con los baculovirus Ac-G1PD (paneles superiores α -G1PD), Ac-G1Dis (paneles medios α -G1) y Ac-DsRed (paneles inferiores α -DsRed). La reactividad de los sueros fue revelada con el anticuerpo secundario anti-ratón ficoeritrina (PE).

Construcción del vector de transferencia pBacPAK9-ie1GPC para la transducción de células de mamífero.

Se propuso obtener un recBV que tuviera la capacidad de expresar la proteína GPC en células de mamífero con el objetivo final de inducir la presentación antigénica vía MHC de clase I y, por consiguiente, el desarrollo de inmunidad celular específica en modelos animales. Para conseguir dicho objetivo en primera medida se construyó el vector de transferencia pBacPAK9-ie1GPC que contiene la secuencia codificante para GPC bajo el control del promotor del gen *ie1* de citomegalovirus (CMV) capaz de ser reconocido por la RNA polimerasa II de mamífero. La figura III.11 muestra en su panel superior el *screening* por PCR del clonado del promotor *ie1*CMV en el vector pBacPAK9-GPC descrito en el capítulo II de esta tesis. El panel inferior muestra la confirmación por digestión con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I liberando el fragmento correspondiente al promotor y al ORF de GPC.

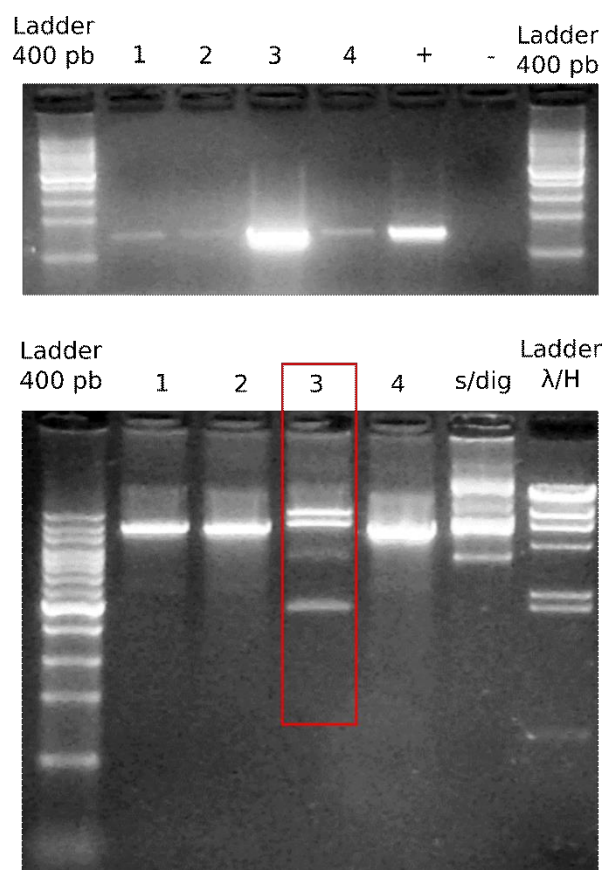


Figura III. 11 *Screening* de clones que hayan incorporado el promotor del gen *ie1* de CMV en el vector pBacPAK9-GPC. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación correspondiente al promotor del gen *ie1* de CMV durante un *screening* por *colony* PCR (panel superior). *Screening* por digestión con *Eco*RI liberando la secuencia correspondiente al promotor clonado y al ORF de GPC (panel inferior).

Expresión de la glicoproteína GPC en células Vero transducidas

Para poder analizar si el baculovirus Ac-ie1GPC es capaz de inducir la expresión de GPC en células de mamífero se realizó un ensayo de transducción incubando una monocapa de células Vero al 60% de confluencia con el recBV durante una hora a 37°C a una MOI de 10. Luego de 24 o 48 hs después de la transducción las células fueron analizadas por citometría de flujo marcando específicamente la proteína GPC en la superficie con el anticuerpo monoclonal GB06-AE05 y luego con un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC. La figura III.12 muestra los resultados obtenidos para las 24 y 48 post-transducción comparando los niveles de fluorescencia obtenidos al incubar las células Vero con el baculovirus Ac-ie1GPC o con AcMNPV wt.

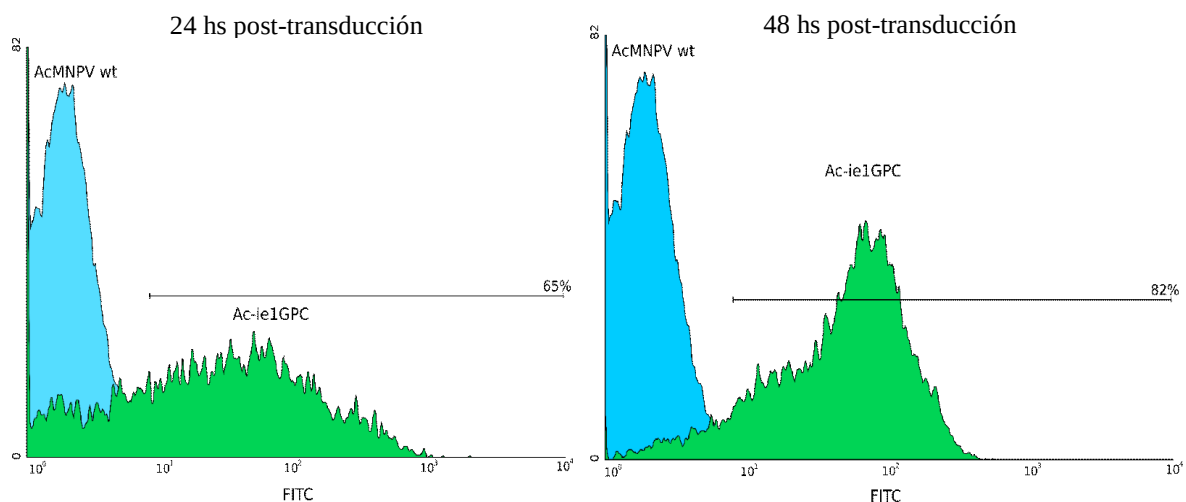


Figura III. 12 Citometría de flujo realizada con células Vero incubadas con el baculovirus Ac-ie1GPC o AcMNPV wt. Para evidenciar la expresión de la proteína heteróloga, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-GPC GB06-AE05 y como anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC. El gráfico muestra el número de eventos en función de la cantidad de fluorescencia para células Vero transducidas con Ac-ie1GPC (verde) y AcMNPV wt (celeste). La ordenada corresponde al número de eventos y la abscisa a la intensidad relativa de fluorescencia verde.

Ensayo de transducción *in vivo* en ratones BALB/c

Para evaluar si la inoculación con el baculovirus Ac-ie1GPC fue capaz de generar una respuesta citotóxica específica se realizaron cultivos de esplenocitos a partir del bazo de ratones inoculados con dicho baculovirus o con el virus control Ac-ie1DsRed. Las suspensiones de esplenocitos fueron pre-

estimuladas durante 2 hs con JUNV (inactivado previamente con UV) y luego enfrentadas a cultivos en monocapa de células A549 transducidas con el baculovirus que induce la expresión de la proteína GPC (A549-GPC) o transducidas con el baculovirus control (A549). Luego de 16 hs se midieron los niveles de apoptosis (mediante la técnica de TUNEL) en la monocapa de células A549 observándose, como muestra la figura III.13, mayores niveles de apoptosis en aquellas células A549 que expresan GPC en su superficie y que fueron enfrentadas a los esplenocitos de ratones inoculados con el virus Ac-*ie1*GPC.

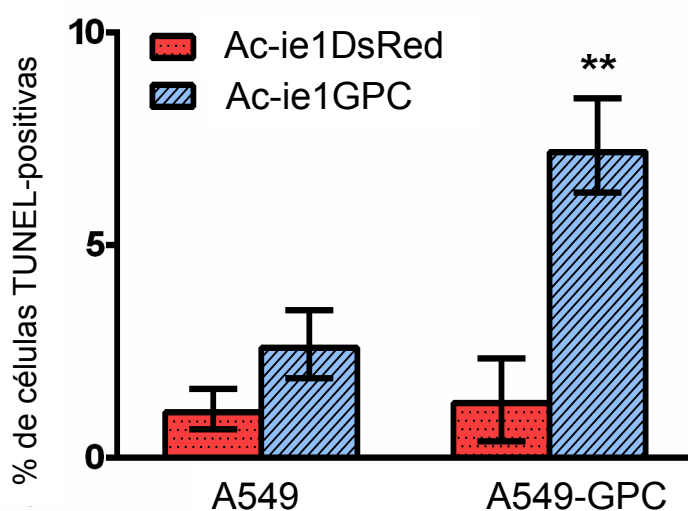


Figura III. 13 Medición del número de células A549 transducidas con Ac-*ie1*GPC (A549-GPC) o con Ac-*ie1*DsRed (A549) que resultaron apoptóticas luego de ser incubadas con esplenocitos provenientes de ratones inoculados con el baculovirus Ac-*ie1*GPC (azul) o Ac-*ie1*DsRed (rojo) mediante la técnica de TUNEL.

Discusión

Se generó un sistema basado en el baculovirus AcMNPV capaz de exponer péptidos de manera superficial, no disponible en nuestro laboratorio hasta el momento de la realización de la presente tesis doctoral. Este sistema incluye un vector de transferencia lo suficientemente versátil como para posibilitar el intercambio de promotores y de péptidos señal y permite la generación de fusiones traduccionales con la proteína GP64. Los resultados de microscopía confocal realizados con el baculovirus Ac-EGFPDis muestran que, si bien la proteína quimérica generada por este sistema se localiza en la membrana plasmática, también lo hace en el citoplasma, por lo que la localización mediada por el péptido señal de GP64 no es del todo efectiva en este contexto. Esto podría deberse a que la compleja estructura tridimensional que forma la proteína verde fluorescente distorsione la estructura de la proteína quimérica e interfiera con su localización. Asimismo, pudo observarse una importante acumulación de fluorescencia en el núcleo, distribución característica de la proteína EGFP.

Con el fin último de generar alternativas para la vacunación de la población de riesgo no alcanzada por Candid#1, se generaron dos recBV con la capacidad de expresar dos proteínas quiméricas de GP64 que incluyen G1 completa de JUNV y un péptido pequeño, responsable de la interacción de la misma con su receptor celular. Si bien se pudo evidenciar la expresión de una de ellas en cultivo celular, no pudo observarse la incorporación de las proteínas quiméricas en la superficie del baculovirus mediante las herramientas con las que contamos hasta el momento.

Por tal motivo, se realizaron ensayos exploratorios en ratones BALB/c utilizando como inmunógeno células Sf9 infectadas con los baculovirus Ac-G1Dis y Ac-G1PD. Los resultados obtenidos fueron alentadores ya que a los 45 días de tratamiento se pudo evidenciar la aparición de anticuerpos específicos contra JUNV. Asimismo, resultó interesante el haber obtenido estos resultados sin la utilización de adyuvantes [126]. Dado que los antígenos particulados suelen tener mejores efectos inmunogénicos, el tamaño de las células infectadas puede haber colaborado con el desarrollo de la respuesta humoral. Además de la posible contaminación de los inóculos con BV que conservan su capacidad adyuvante [41].

A pesar de que al momento no pudo demostrarse la exposición superficial, la identificación del péptido G1PD que contiene los residuos responsables de la interacción de la proteína G1 de JUNV con su receptor celular y la observación de la inmunogenicidad de dicho fragmento de G1 así como de G1 completa son evidencias importantes para continuar con su caracterización como inmunógenos.

La utilización de los BV de los recBV Ac-G1Dis y Ac-G1PD en ensayos *in vivo* reveló que ambos virus son capaces de inducir la generación de anticuerpos específicos contra JUNV. Si bien los niveles de reactividad observados por inmunofluorescencia de los sueros provenientes de animales inoculados con Ac-G1PD fueron inferiores a los obtenidos tanto con Ac-G1Dis como con el baculovirus Ac-GPC descrito en el capítulo II, resulta interesante probar la capacidad neutralizante de los sueros obtenidos (Figuras II.14 y III.11).

Paralelamente, se desarrollaron vectores que permitieron la generación de baculovirus con capacidad transductora en células de mamífero. Esto fue evaluado con el baculovirus Ac-ie1DsRed en diferentes tipos celulares. Del mismo modo, se obtuvo el baculovirus Ac-ie1GPC y su capacidad transductora se evidenció por *Western Blot* y por citometría de flujo.

En ensayos *in vivo* inoculando ratones BALB/c con ambos baculovirus pudo observarse la capacidad de Ac-ie1GPC para desarrollar inmunidad celular específica contra JUNV. Cultivos de esplenocitos provenientes de ratones inoculados con dicho baculovirus y pre-estimulados con JUNV inactivado mostraron actividad citotóxica específica al inducir mayores niveles de apoptosis en cultivos celulares con expresión superficial de la proteína GPC. Estos resultados confirman lo descrito por Golden y colaboradores [139] quienes desarrollaron una vacuna a DNA utilizando preparaciones plasmídicas que codifican para la proteína GPC bajo el control de un promotor de mamífero. Mediante electroporación *in vivo* en el músculo previamente inoculado con el plásmido logran transfectar células somáticas que luego de expresar la proteína recombinante la procesan mediante la vía del proteasoma y la presentan por la vía MHC de clase I. En ese trabajo se confirmó la generación de inmunidad celular de memoria específica de JUNV y, además, se observó la protección de cobayos frente a desafíos con el agente etiológico. Sin embargo, la técnica de electroporación *in vivo* es una práctica costosa y dependiente de instrumental

específico que muy difícilmente pueda ser utilizada en humanos como un procedimiento de inmunización masiva. Más aún, la utilización de vectores plasmídicos provenientes de bacterias que incluyan además genes de resistencia a antibióticos presentaría numerosos obstáculos para su implementación clínica. En ese sentido, la utilización de baculovirus como vectores para vehiculizar genes de interés puede ser una solución a ambas limitantes dada su eficiencia en el *delivery* del material genético, su incapacidad de replicar o integrar su genoma en células de mamífero y la inexistencia de posibles contaminantes pirógenos y de genes de resistencia a antibióticos.

Nuestros resultados preliminares son muy alentadores y es necesario continuar profundizando la caracterización de la respuesta desarrollada analizando independientemente cada población celular y las citoquinas involucradas.

La obtención de estos virus recombinantes y el desafío posterior con el agente etiológico en modelos animales adecuados resulta de sumo interés para su utilización en el corto plazo como vector de inmunización con el fin último de generar una alternativa a la vacuna que se suministra actualmente, permitiendo alcanzar de ese modo a poblaciones de riesgo que en la actualidad no pueden ser inmunizadas con una vacuna a virus atenuados.

Capítulo IV

Baculovirus como
vector de terapia
génica contra
tumores pituitarios

Introducción

Los vectores de terapia génica constituyen una herramienta poderosa para el tratamiento de múltiples patologías. Pueden clasificarse en dos grandes categorías: vectores no virales y virales. Los vectores no virales consisten principalmente en vectores plasmídicos vehiculizados por polímeros que permiten el *delivery* del DNA facilitada por la formación de complejos, como los formados con lípidos cargados positivamente. Aunque estos vectores presentan ventajas en cuanto a su bioseguridad, su aplicación está limitada por la baja eficiencia en el *delivery* y la expresión de transgenes [140]. Por otra parte, los vectores virales, tales como los derivados de lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados (AAV), tienen una mayor eficiencia en la entrada celular y la transducción de diferentes genes heterólogos (transgenes). Esencialmente, cualquier virus puede ser convertido en un vector de genes y las ventajas y desventajas dependerán de cada vector viral en particular. El mecanismo de replicación y el riesgo biológico inherente a su uso debido a que se trata de patógenos humanos modificados, son algunas de las características para ser analizadas en el momento en el que se elige un vector viral para terapia génica. En comparación con los vectores virales más comúnmente utilizados, los baculovirus poseen una serie de ventajas que les confieren una elevada potencialidad para su uso clínico.

En primer lugar, la transducción (proceso por el cual los vectores virales ingresan a la célula y conducen a la expresión de un gen heterólogo) mediada por baculovirus no presenta ningún efecto tóxico contra las células de mamíferos y no perturba el crecimiento celular incluso a alta MOI [141, 142]. Por otra parte, los baculovirus no son capaces de replicar en células de mamífero transducidas [143]. Estas características de los baculovirus son particularmente importantes y, en sumatoria con el hecho de que no se trata de virus patógenos humanos, representan una ventaja significativa en relación al riesgo biológico.

Otra ventaja de los baculovirus como vectores de terapia génica consiste en su capacidad de incorporación de DNA foráneo de gran tamaño. AcMNPV posee un genoma a DNA circular de 134 kpb de longitud y una capacidad de inserción de al menos 38 kpb adicionales. Esto resulta particularmente ventajoso frente a los vectores retrovirales y AAV [144].

En comparación con otros vectores virales, los baculovirus son fáciles de producir. Otros vectores como, por ejemplo, los retrovirales, lentivirales, adenovirales y derivados de AAV, requieren la propagación en líneas celulares complementadoras que expresan proteínas y factores esenciales para su producción. En contraste, los baculovirus pueden ser propagados fácilmente mediante la infección de células de insecto en cultivo en suspensión o en monocapa. Además, la construcción, propagación, y la manipulación de los baculovirus se puede realizar en laboratorios de bioseguridad nivel 1 (BSL-1) sin la necesidad de equipamiento especializado.

Por último, una de las ventajas más importantes reside en que los mamíferos no presentan inmunidad preexistente contra los baculovirus. Uno de los problemas asociados con otros vectores virales es que la mayoría de las personas están expuestas a estos virus y por ende al desarrollo de respuesta humoral específica. Los anticuerpos circulantes pueden reducir significativamente la eficiencia de la transducción con el vector viral. En contraste, el uso de baculovirus como vectores de terapia génica, reduce considerablemente los problemas asociados a la inmunidad preexistente [144].

En este contexto y en el marco de una colaboración con el grupo dirigido por la Dra. Adriana Sellicovich (INBIOMED, UBA-CONICET), se abordó el estudio del rol del péptido humanina (HN) en el desarrollo de tumores pituitarios utilizando al baculovirus AcMNPV como vector para la transducción de cultivos celulares, así como vector de terapia génica en ensayos *in vivo*.

La adenohipofisis o glándula pituitaria libera hormonas de manera pulsátil; los pulsos se encuentran sincronizados por los patrones de secreción de las hormonas hipotalámicas [145]. El hipotálamo, a su vez, libera sustancias estimuladoras o inhibitoras de la síntesis de hormonas pituitarias, mediante los axones de las neuronas que llegan a la eminencia media. Los estímulos físicos y psíquicos que llegan al sistema nervioso central afectan al hipotálamo, estimulando o inhibiendo las neuronas que influyen sobre la actividad de la adenohipófisis. La función adenohipofisaria es regulada por factores periféricos y locales así como hormonas liberadas por las glándulas blanco, las cuales ejercen un *feedback* negativo sobre las hormonas hipofisarias. Además de este control hipotalámico y de la regulación ejercida por hormonas periféricas, las células adenohipofisarias pueden ser fuente de señales que intervienen en el

control local de las funciones de dicha glándula mediante mecanismos autocrinos, paracrinos o yuxtacrinos [146]. Existen numerosas moléculas sintetizadas localmente que están involucradas en la regulación de la secreción hormonal adenohipofisaria. Además, las células endoteliales, los pericitos y el propio tejido conectivo pueden liberar factores de crecimiento, citoquinas, proteoglicanos y proteasas capaces de actuar de manera paracrina sobre la liberación hormonal adenohipofisaria [146].

La humanina (HN) es un péptido de 28 aminoácidos originalmente aislado a partir de bibliotecas de cDNA de pacientes enfermos de Alzheimer. Se encuentra codificado de forma solapada en la secuencia que codifica para el RNA ribosómico 16S mitocondrial. La HN y la ratina (HNr), un péptido homólogo en rata, han sido detectadas en varios tejidos y tienen una acción antiapoptótica (Figura IV.1).

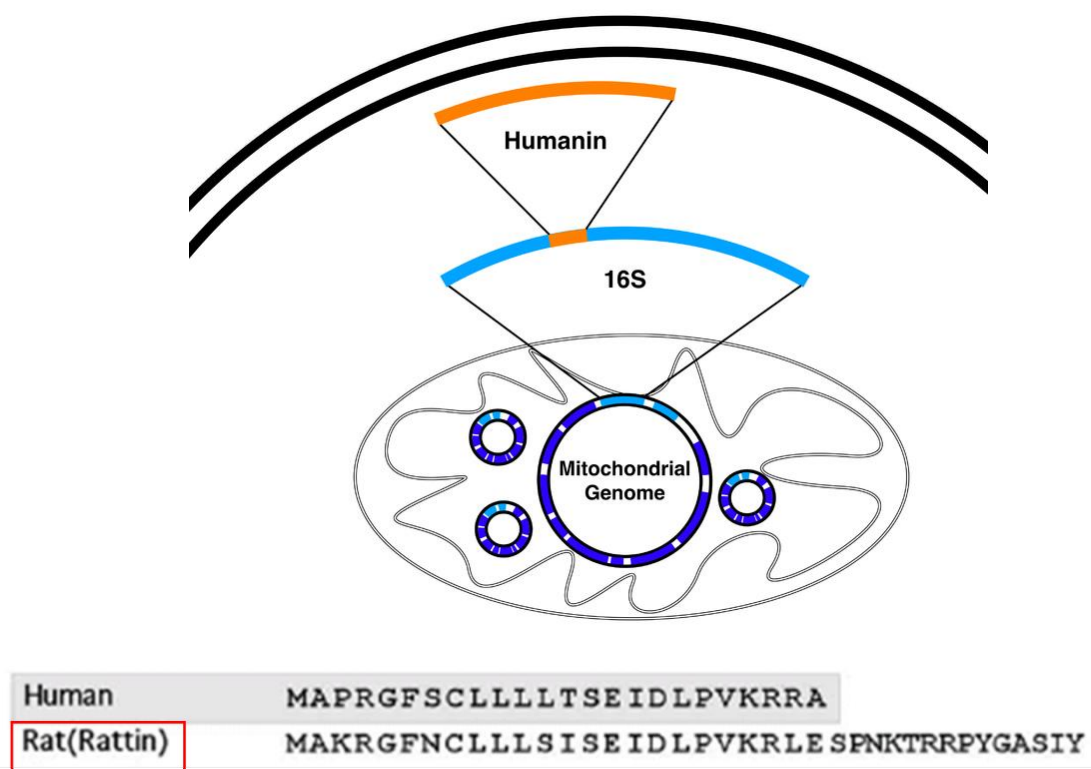


Figura IV. 1 Esquema de la disposición genómica mitocondrial de la secuencia codificante para el péptido humanina (panel superior) y comparación de la secuencia aminoacídica de los péptidos humanina y ratina (panel inferior)

En ratas adultas, la presencia de HNr fue detectada en corteza cerebral, hipocampo, testículo y músculo esquelético, entre otros. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la HNr se expresa en la adenohipófisis de ratas hembras y machos, mostrando un dimorfismo sexual. Los estrógenos parecen inhibir la expresión de HNr. La HNr también se expresa en células pituitarias tumorales, pero en estos casos no se observa respuesta a la acción estrogénica inhibitoria.

Numerosos estudios han demostrado que la HN suprime la muerte en neuronas expuestas a agresiones como el péptido β -amiloide, el estrés oxidativo, la carencia de suero y la hipoxia. Los efectos citoprotectores de la HNr han sido descritos en diversos tipo celulares, entre ellos neuronas, linfocitos, células hematopoyéticas, células β pancreáticas, células germinales testiculares y células de Leydig.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la HN ejerce una acción antiapoptótica en células adenohipofisarias, especialmente lactotropas y somatotropas, así como en células GH3 de tumores somatolactotropos.

Los prolactinomas son los tumores más frecuentemente encontrados en la hipófisis y representan casi el 15 % de todos los tumores intracraneales. Si bien los prolactinomas son más frecuentes en mujeres que en hombres, no hay evidencia clara de una correlación directa entre la exposición a estrógenos y el desarrollo de los prolactinomas. Aunque los prolactinomas pueden ser tratados efectivamente con agonistas dopaminérgicos, alrededor del 20 % de los pacientes desarrollan resistencia al tratamiento por lo que es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes en esta patología. La expresión de ciertos genes en prolactinomas humanos y de rata ha sido caracterizada, observándose que algunos de ellos se encuentran relacionados con la proliferación celular y la apoptosis. Recientemente ha sido demostrado que la HN está sobreexpresada en células de cáncer gástrico, sobre las cuales ejerce una actividad antiapoptótica, sugiriendo que la estimulación de la expresión de este péptido sería un importante evento molecular en la tumorigénesis.

En estudios preliminares del grupo del INBIOMED se demostró que tanto en cultivos celulares tumorales pituitarios como en muestras extraídas de pacientes y de modelos animales convalecientes existe una significativa sobre-expresión del péptido HN.

Además, se observó que al incubar células GH3 con HN exógena la apoptosis disminuye significativamente. Para caracterizar el mecanismo por el cual la HN sería capaz de inhibir la apoptosis se repitieron los ensayos incubando las células con HN y TNF- α en presencia de diferentes inhibidores de factores que actúan en las distintas vías pro-apoptóticas, sugiriendo que STAT3, NF κ B y la familia de Bcl2 estarían involucrados en la acción anti-apoptótica generada por la HN en células pituitarias. En conclusión, el mecanismo de acción de la HN en células tumorales pituitarias exhibe cierta complejidad e involucra múltiples vías. Por ello ha resultado de gran interés contar con un método que permita analizar el comportamiento de las células tumorales al ser desprovistas de la expresión endógena de HN [147].

En ese sentido, el silenciamiento mediado por RNA de interferencia (RNAi) es una herramienta valiosa que permite regular negativamente y de forma selectiva la expresión de proteínas y péptidos [148]. El mecanismo de acción de los RNAi consiste principalmente en una función de silenciamiento post-transcripcional altamente conservada mediada por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). El silenciamiento de un gen determinado puede obtenerse de dos formas diferentes: (i) utilizando directamente moléculas de dsRNA que por algún método son introducidas en el interior de las células (siRNA) o bien (ii) utilizando moléculas de DNA que codifiquen para una molécula pequeña de RNA con estructura secundaria de horquilla, *short hairpin* RNA (shRNA), y de este modo la especie de RNA capaz de mediar el silenciamiento se expresa directamente en el interior de la célula .

Para llevar adelante la expresión de un shRNA es necesario diseñar de forma meticulosa el vector que será utilizado para vehiculizarlo. En primer lugar, es necesario elegir un promotor adecuado que controle la transcripción. El promotor más utilizado es el promotor U6 que es reconocido por la RNA polimerasa III. Dicha RNA polimerasa es la encargada de sintetizar moléculas de RNA pequeños en la célula y diversos trabajos han demostrado que es muy eficiente en la transcripción de shRNA. Un shRNA típico se encuentra conformado por

una región de doble cadena de entre 19 y 25 bp complementarios con la secuencia *target*, conectados entre sí por un *loop* simple cadena de entre 5 y 10 bases. Finalmente, la construcción del vector debe incorporar una secuencia terminadora de la transcripción que sea reconocida por la RNA polimerasa III. Una vez expresado el shRNA en el interior de la célula, la molécula de dsRNA resultante sigue el camino de maduración característico de los miRNA y de este modo es capaz de llevar adelante su función regulatoria (Figura IV.2).

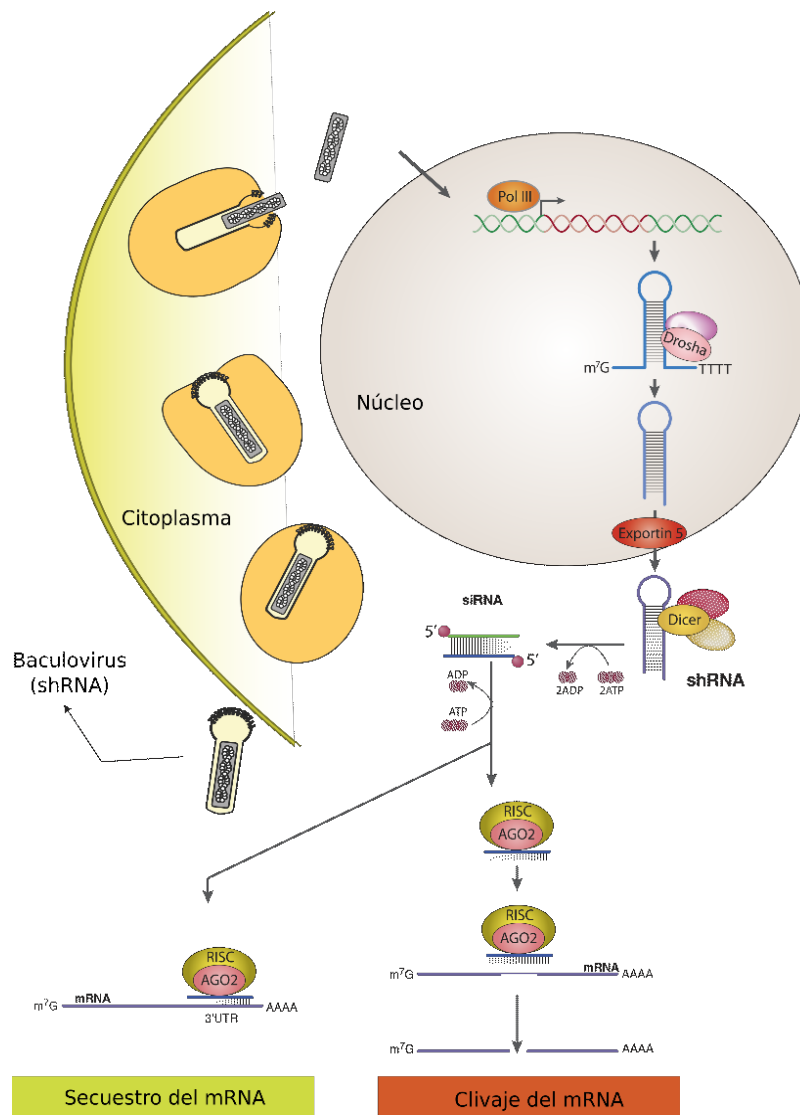


Figura IV. 2 Esquema explicativo de la maduración y función de un shRNA vehiculizado por un baculovirus. Brevemente, el virión brotante baculoviral ingresa a la célula por endocitosis, la nucleocápside es liberada al citoplasma y el DNA llega al núcleo. La RNA polimerasa III reconoce el promotor U6 que controla la expresión del shRNA y comienza la transcripción. El resultado de la transcripción es procesado secuencialmente por las proteínas Drosha (en el núcleo) y Dicer (ya en el citoplasma). Finalmente, una de las hebras del RNA doble cadena resultante es cargada por el complejo formado por RISC y AGO2 para ejercer su función regulatoria.

El objetivo general del presente capítulo consistió en el diseño, la obtención y el análisis del efecto de un shRNA (*short hairpin RNA*) con el mRNA de HN como “blanco” y en la generación de un baculovirus AcMNPV recombinante capaz de vehicular dicho *cassette* de silenciamiento.

Objetivos específicos del capítulo

1. Diseño de un shRNA con la capacidad de regular negativamente la expresión de los péptidos Humanina (HN) y Ratina (HNr) en tumores pituitarios y obtención de recBV con capacidad transductora.
2. Detección de la expresión de HNr en cultivos celulares tratados con plásmidos portadores del *cassette* de silenciamiento y con los recBV y medición de la funcionalidad citoprotectora de HNr.
3. Evaluación de la sobrevida y progresión tumoral en un modelo animal adecuado para tumores pituitarios.

Materiales y métodos

Diseño del shRNA específico de HN y HNr

Dado que la secuencia nucleotídica de la ratina (HNr) posee un 73% de identidad con la secuencia codificante para la humanina (HN), se diseñó un shRNA cuya secuencia blanco fuera completamente complementaria a la región en la que ambas secuencias son idénticas. De este modo, se incrementó la posibilidad de que el shRNA sea capaz de reconocer el mRNA que codifica para cada uno de los péptidos y consiguientemente conducir al clivaje del mismo (Figura IV.2).

La secuencia diseñada *in silico* es la siguiente:

GACCCTATGGAGCTTCAATTTAGAGAACTTAAATTGAAGCTCCATAGGGTC,

dónde la secuencia resaltada en gris corresponde al *loop* que conecta ambas hebras de la horquilla.

Construcciones plasmídicas

Para llevar adelante dicho objetivo, se diseñó un shRNA con la secuencia correspondiente a un tramo del mRNA de la HN y de la HNr como secuencia *target* y se sintetizó un *cassette* (GenScript®) capaz de dirigir la expresión del mismo bajo el control del promotor U6, adicionando además la secuencia codificante para el gen indicador *dTomato* bajo el control del promotor del gen *ie1* de citomegalovirus, con el objetivo de poder diferenciar fácilmente aquellas células que fueron transformadas exitosamente de aquellas que no lo fueron. Adicionalmente se incorporaron sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción con el objetivo de generar vectores versátiles que permitieran realizar futuros nuevos ensayos cambiando la secuencia del shRNA deseado. (Figura IV.3).

Con el fin de evaluar el funcionamiento del sistema y el rol del silenciamiento de HN en cultivo celular, se clonó el *cassette* previamente descrito en el vector pUC57 generando el plásmido pUC57-shHN.

Asimismo, se clonó el *cassette* de silenciamiento en el vector de transferencia pBacPAK9 para permitir la generación de recBV que incorporen la construcción previamente realizada en su genoma, dando origen al vector pBacPAK9-shHN. Los plásmidos fueron recibidos inmovilizados en papel de filtro estéril y fueron resuspendidos en 40 µl de agua estéril y utilizados para transformar *E.coli* electrocompetentes (cepa TOP10).

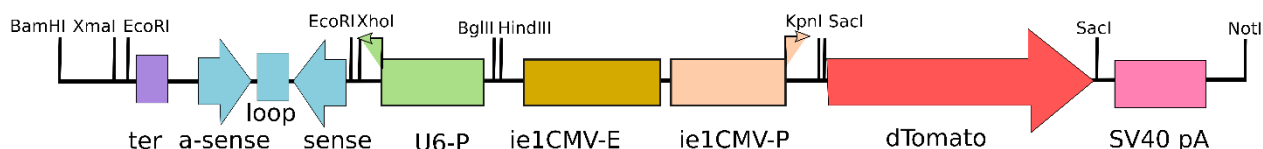


Figura IV. 3 Esquema del *cassette* de silenciamiento que incorpora la secuencia que codifica para el shRNA específico para HN y HNr bajo el control del promotor U6 de la RNA pol III (U6-P). Adicionalmente se incorporó la secuencia codificante para la proteína dTomato bajo el control del promotor del gen *ie1* de CMV fusionado a un *enhancer* (ie1CMV-E; ie1CMV-P).

Construcciones plasmídicas control

Utilizando sitios de restricción de *EcoRI* incorporados durante el diseño a ambos lados de la secuencia del shRNA, se generó el vector pUC57-shRNA(-). Para ello se digirió 1 µg de preparación plasmídica con la enzima *EcoRI* durante 3 hs a 37°C. Luego, se inactivó la enzima de restricción durante 20 min a 75°C y se diluyó la mezcla de digestión mil veces con el objetivo de favorecer únicamente la religación unimolecular. Finalmente, se tomaron 2 µl de la dilución previamente realizada y se preparó una mezcla de ligación utilizando la enzima ligasa de fago T4. Luego de la incubación pertinente a 16°C durante 12 hs, se transformaron *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Finalmente, siguiendo la misma metodología para generar el plásmido pUC57-shRNA(-), se obtuvo el vector de transferencia control pBacPAK-shRNA(-). La secuencia de ambos vectores fue confirmada por el método de secuenciación tradicional de Sanger en MacroGen (www.macrogen.com). Dichos vectores fueron utilizados como controles negativos en los ensayos posteriores.

Cultivo de células GH3

Las células GH3 (línea celular somatolactotrópica tumoral proveniente de adenoma de rata) se cultivaron en medio de cultivo D-MEM con SFB 10 % suplementado con aminoácidos MEM (10 µl/ml), L-glutamina (2 mM), anfotericina B (5.6 µg/ml), y estreptomicina (100 mg/ml). Las células fueron cosechadas cuando llegaron a una confluencia del 80 %. Brevemente, se lavaron dos veces

con PBS con el fin de remover restos de SFB que pudieran interferir con la actividad enzimática de la tripsina. Las células fueron incubadas con 0.025 % de tripsina-EDTA y luego con DMEM-S con SFB 10 % para bloquear la tripsina. Posteriormente, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos (1×10^5 células/ml/pocillo) para determinar la apoptosis por el método de TUNEL, las células fueron preincubadas con HN (0.5 μ M) durante 2 hs. antes del agregado de TNF- α (50 ng/ml) durante 24 hs.

Transformación de células GH3 con las construcciones obtenidas

Se transfectaron células GH3 con los plásmidos pUC57-shHN y pUC57-sh(-) utilizando como reactivo de transfección Lipofectamina y siguiendo las indicaciones del proveedor. Para ello, se sembraron 10^6 células GH3 en placas de 12 pocillos y una vez adheridas se incubaron las mismas con 1 μ g del plásmido correspondiente y el reactivo de transfección. Se tomaron muestras a las 16, 24 y 48 hs y se determinó la expresión del gen indicador y de HNr. En algunos experimentos, las células fueron incubadas con TNF- α (50 ng/ml) durante otras 24 h. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 %.

Expresión del gen indicador *dTomato*

Se observó la expresión del gen indicador dTomato en las células transfectadas mediante microscopía de epifluorescencia utilizando el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse para monitorear el cultivo celular sin necesidad de detener el experimento. La aparición de fluorescencia se tomó como indicativo para proceder al procesamiento de las muestras y continuar con la medición de HNr.

Immunolocalización de HNr

La presencia de HNr en células GH3 fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta. Las células GH3 cultivadas en cubreobjetos de vidrio fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4%. Las células fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo anti-HNr (Sigma, 1: 100), y luego durante 1 h con IgG anti-conejo FITC (Vector Laboratories, 1:50). Finalmente, los preparados fueron montados en medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EEUU) conteniendo 4', 6-diamino-2 dihidrocloro fenilindol (DAPI) para marcación de DNA y visualizadas en un microscopio de fluorescencia

(Axiophot, Carl Zeiss Jena, Alemania). Los controles fueron incubados con el suero normal correspondiente o IgG en lugar de anticuerpo primario.

Determinación microscópica de la fragmentación del DNA (Método TUNEL)

Las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas con 4 % de paraformaldehído en PBS durante 10 min. y permeabilizadas mediante irradiación por microondas (370 W, 5 min) en buffer citrato 10 mM pH 6. Los puntos de ruptura de las cadenas de DNA fueron marcados con desoxi-UTP conjugado con digoxigenina, utilizando desoxinucleotidiltransferasa terminal (0.18 U/ μ l) de acuerdo al protocolo del fabricante. Luego de una incubación con 10 % de suero normal de burro en PBS por 40 min, las células fueron incubadas por 1 h con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con FITC (1:10) para detectar la incorporación de nucleótidos a los extremos 3'-OH del DNA fragmentado. Finalmente, las células fueron montadas y visualizadas como fue descrito. El porcentaje de células adenohipofisarias apoptóticas fue calculado como $[(\text{TUNEL+})/\text{células totales}] \times 100$, el porcentaje de células transfectadas como $[(\text{TUNEL+ dTomato+})/\text{células dTomato+ totales}] \times 100$.

Obtención de los baculovirus recombinantes Ac-shHN y Ac-sh(-).

Se utilizó el sistema desarrollado por Je *et al.* (2001, 2003), basado en un bácmido (genoma viral capaz de replicar en *E. coli*, denominado *bAcGOZA*) deficiente en el gen esencial ORF1629 y el rescate de DNA viral viable por recombinación con un plásmido de transferencia que contiene ese gen junto con otros que se desea expresar [123], [122]. Para ello, se cotransfectaron los DNA del plásmido de transferencia y del bácmido en células Sf9 empleando el reactivo Cellfectin II, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Preparación de los inóculos de viriones brotantes

Se infectaron células High FiveTM con los diferentes recBV (Ac-shHN y Ac-sh(-)) y luego de 72 hs se colectó el sobrenadante. Se centrifugaron los viriones brotantes a 14.000 rpm durante 40 minutos y fueron resuspendidos en PBS.

Ensayo *in vivo* en ratones *nude*

Un total de 16 ratones *nude* fueron inoculados por vía subcutánea con 10^6 células GH3. Se observó la aparición de tumor monitoreando los animales diariamente y tomando registro del volumen tumoral. Cuando los tumores

alcanzaron los 1000 mm³ (aproximadamente 30 días post-inoculación) se administró por vía intratumoral el baculovirus Ac-shHN (8 animales) o el baculovirus Ac-sh(-) como control (8 animales). Luego, se continuó con el monitoreo y el registro del volumen tumoral así como de la mortalidad de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales.

Resultados

Verificación de las construcciones para el silenciamiento

Los plásmidos pUC57-shHN y pBacPAK9-shHN fueron transformados en *E.coli* TOP10 competentes. A continuación, se propagaron las bacterias recombinantes en cultivo líquido y se realizó una preparación de DNA plasmídico con el fin de observar la integridad y el tamaño de los mismos a través de electroforesis en gel de agarosa (Figura IV.4 panel izquierdo). La Figura IV.4 panel derecho muestra los productos de digestión de los vectores pUC57-shHN y pBacPAK9-shHN con la enzima *EcoRI*. De este modo pudo confirmarse que la síntesis de los mismos en esa región fue correcta. Asimismo, pudo observarse que el tamaño de ambos vectores digeridos fue el esperado (4,5 kpb para el plásmido pUC57-shHN y 7,3 kpb para el plásmido pBACPAK9-shHN).

A continuación, de acuerdo a la metodología descrita en la sección “Materiales y métodos”, se obtuvieron los vectores control pUC57-sh(-) y pBacPAK9-sh(-) y se procedió a los ensayos en cultivo celular.

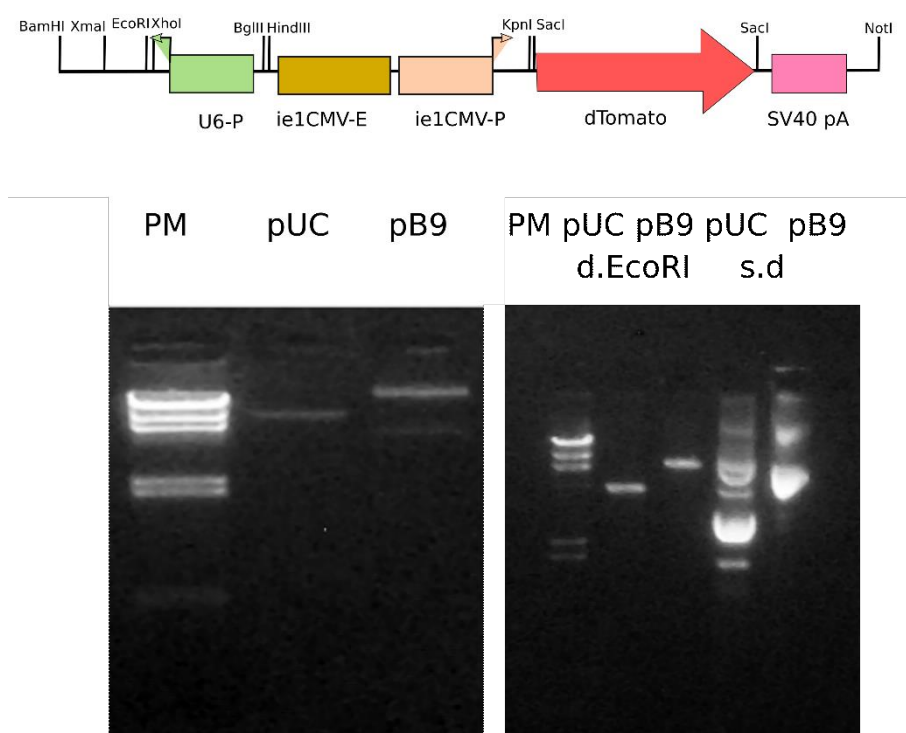


Figura IV. 4 Esquema de la construcción control (panel superior). Electroforesis en gel de agaosa para determinar integridad y tamaño de las construcciones (panel inferior izquierdo) y corrida electroforética de la digestión con *EcoRI* para la obtención de la construcción control.

Ensayos de expresión transitoria en cultivo celular.

Para evaluar si la inhibición de la HNr afecta la apoptosis de células pituitarias GH3 se realizaron, en primera medida, ensayos de expresión transitoria mediante la transfección *in vitro* del plásmido pUC57-shHN. Mediante la cuantificación de células GH3 dTomato-positivas a distintos tiempos post-transfección (Figura IV.5) pudo observarse una mayor eficiencia de transfección (32 %) utilizando 1µg de DNA sobre 5×10^5 células.(Figura IV.6).

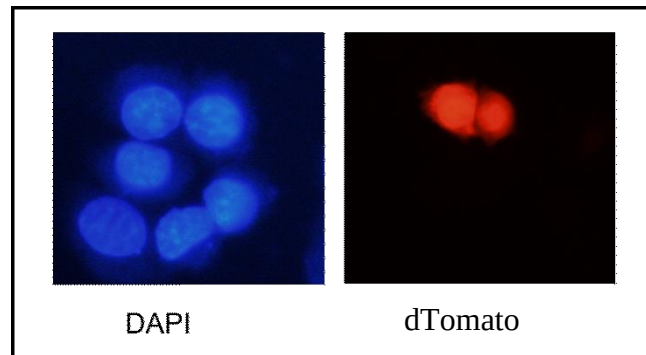


Figura IV. 5 Transfección con el plásmido pUC57-shHN y verificación de la expresión de la proteína dTomato.

Ya a las 16 hs post-transfección se observó la expresión de dTomato. Coincidentemente, se observó una disminución de la expresión de HNr en células detectada por inmunofluorescencia (Figura IV.6).

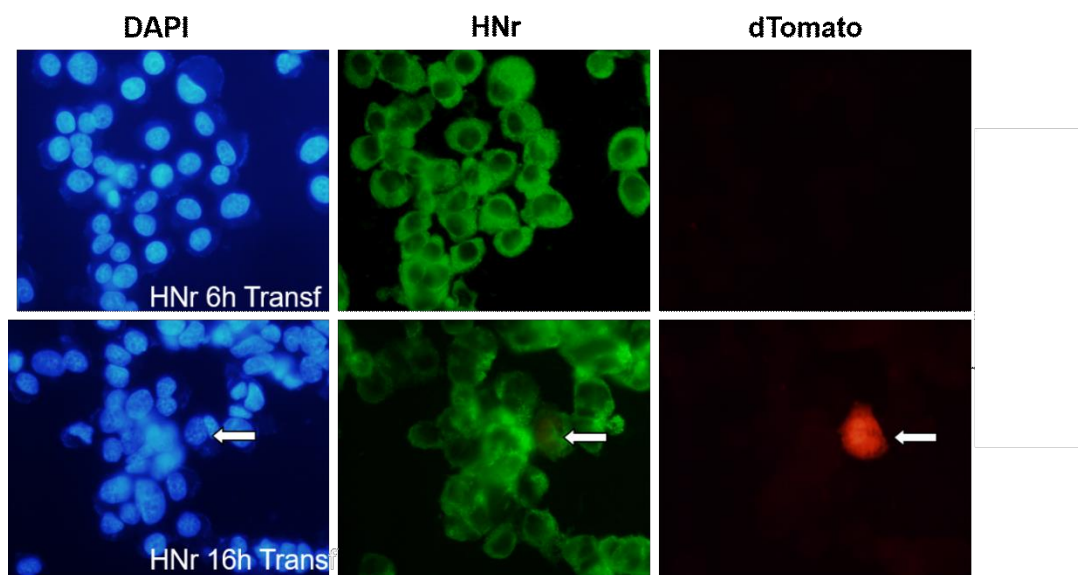


Figura IV. 6 Transfección con el plásmido pUC57-shHN y detección de HNr por inmunofluorescencia 6 (superior) y 16 (inferior) horas post-transfección. Las flechas blancas indican aquellas células dTomato+ con expresión disminuída de HNr.

Ensayos de funcionalidad del silenciamiento de HNr

Para determinar el efecto del silenciamiento de la HNr, se evaluaron los niveles de apoptosis en células GH3 luego de distintos tiempos de transfección con el plásmido pUC57-shHN y el plásmido control. Luego de 16 hs. de transfección, no hubo diferencias entre los niveles de apoptosis en células GH3 totales transfectadas con el plásmido control y con el plásmido pUC57-shHN. Sin embargo, la inhibición de la expresión de HNr mediante el plásmido pUC57-shHN produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de apoptosis en células GH3 en comparación con las células tratadas con el plásmido control, luego de 24 y 48 hs post-transfección. Por su parte, al analizar solamente las células dTomato positivas, es decir, las células efectivamente transfectadas, observamos un incremento mucho más notable en los niveles de apoptosis a las 24 y 48 hs (Figura IV.7).

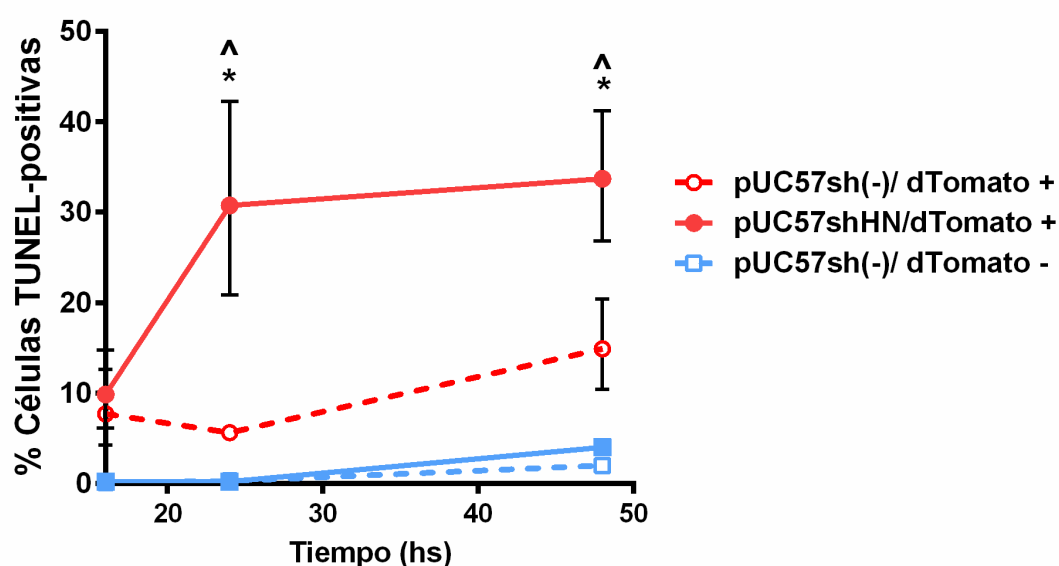


Figura IV. 7 Porcentaje de células apoptóticas medidas por la técnica de TUNEL en función del tiempo luego de la transfección con el plásmido pUC57-shHN o con el plásmido control.

También se propuso evaluar la acción de la HNr endógena frente al estímulo proapoptótico del TNF- α . Para lograr dicho objetivo, se transfectaron células GH3 con ambos vectores plasmídicos de forma independiente. Luego de 24 hs. las células fueron incubadas con TNF- α por otras 24 hs. En la población total de células, el TNF- α aumentó los niveles de apoptosis tanto en células tratadas con el plásmido control como con pUC57-shHN (Figura IV.8 A). En células dTomato positivas, el shRNA produjo un incremento de la apoptosis basal y la inducida por el TNF- α , siendo el efecto proapoptótico del TNF- α mayor en células transfectadas con el plásmido pUC57-shHN que con el plásmido control (Figura IV.8 B). Estos resultados muestran que el RNA de interferencia inhibe la expresión de la HNr y que esta inhibición produce un aumento en la apoptosis, indicando que la HNr endógena ejercería un efecto antiapoptótico. Además, la inhibición de la HNr resultó en un aumento en la apoptosis inducida en presencia de TNF- α , sugiriendo que la HNr endógena protegería a las células de la apoptosis inducida por TNF- α .

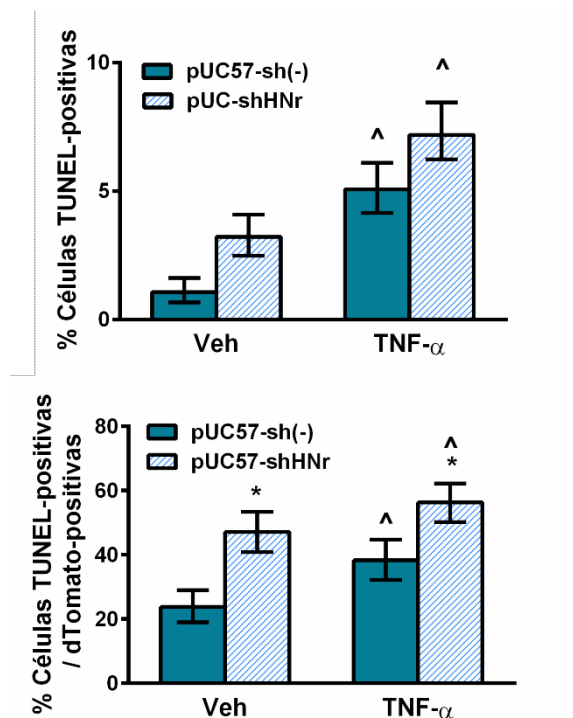


Figura IV. 8 Efecto de la inhibición de HNr endógena sobre la apoptosis inducida por TNF- α en células GH3. Células GH3 fueron transfectadas con 1 μ g del DNA de plásmido control (pUC57-shARN(-)) o plásmido con el RNA de interferencia para HNr (pUC57-shHN) durante 24 hs e incubadas con TNF- α (50 ng/ml) durante otras 24 hs o con medio de cultivo (Veh). La apoptosis fue evaluada por el método de TUNEL en células totales (panel superior) y células transfectadas dTomato+ (panel inferior). * $p < 0.05$ vs. respectivo plásmido control, ^ $p < 0.05$ vs. respectivo control sin TNF- α .

Obtención de los baculovirus recombinantes Ac-shHN y Ac-sh(-)

Se co-transfectaron células de insecto High Five™ con el bácmido bAcGOZA y el plásmido pBacPAK9-shHN o pBacPAK9-sh(-) respectivamente. Se monitorearon los cultivos por microscopía de campo claro hasta observar la formación de poliedros a las 96 horas post transfección. Del mismo modo, se observó la aparición de fluorescencia roja, correspondiente a la expresión de la proteína reportera dTomato, mediante microscopía de epifluorescencia en células High Five™ infectadas con el sobrenadante de la co-transfección (Figura IV.9). De esta forma, se obtuvo el recBV que lleva en su genoma el *cassette* de silenciamiento (Ac-shHN) y el baculovirus control (Ac-sh(-)) que sólo expresa la proteína dTomato.

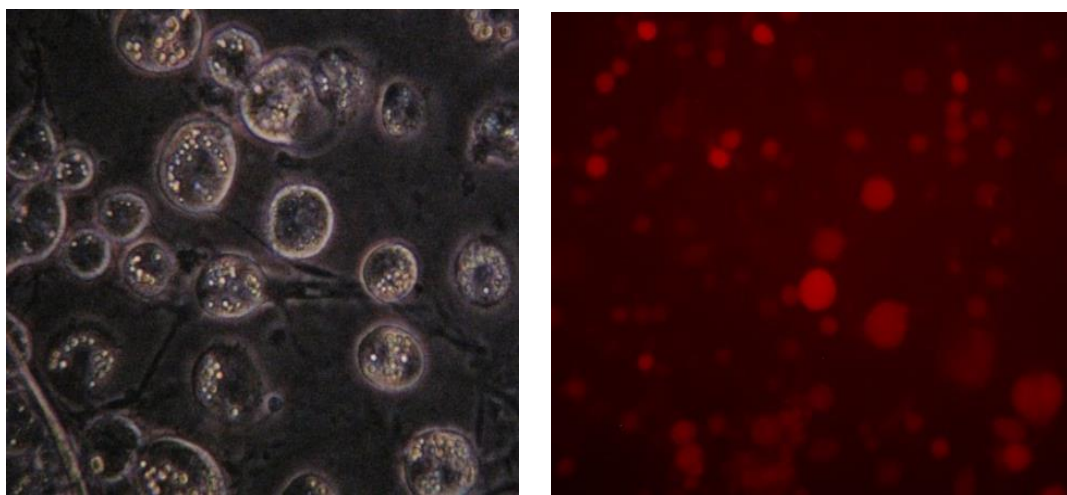


Figura IV. 9 Obtención del baculovirus recombinante Ac-shHN. Aparición de poliedros en las células High Five™ co-transfectadas con el vector de transferencia y el bácmido bAcGOZA 96 hs post-transfección (panel izquierdo). Expresión de la proteína fluorescente dTomato en cultivo de células High Five™ infectado con el sobrenadante de co-transfección (panel derecho).

Transducción de células GH3 mediada por baculovirus

Se incubaron células GH3 con los recBV utilizando una MOI de 10 obteniéndose una eficiencia de transducción superior al 80% (Figuras IV.10).

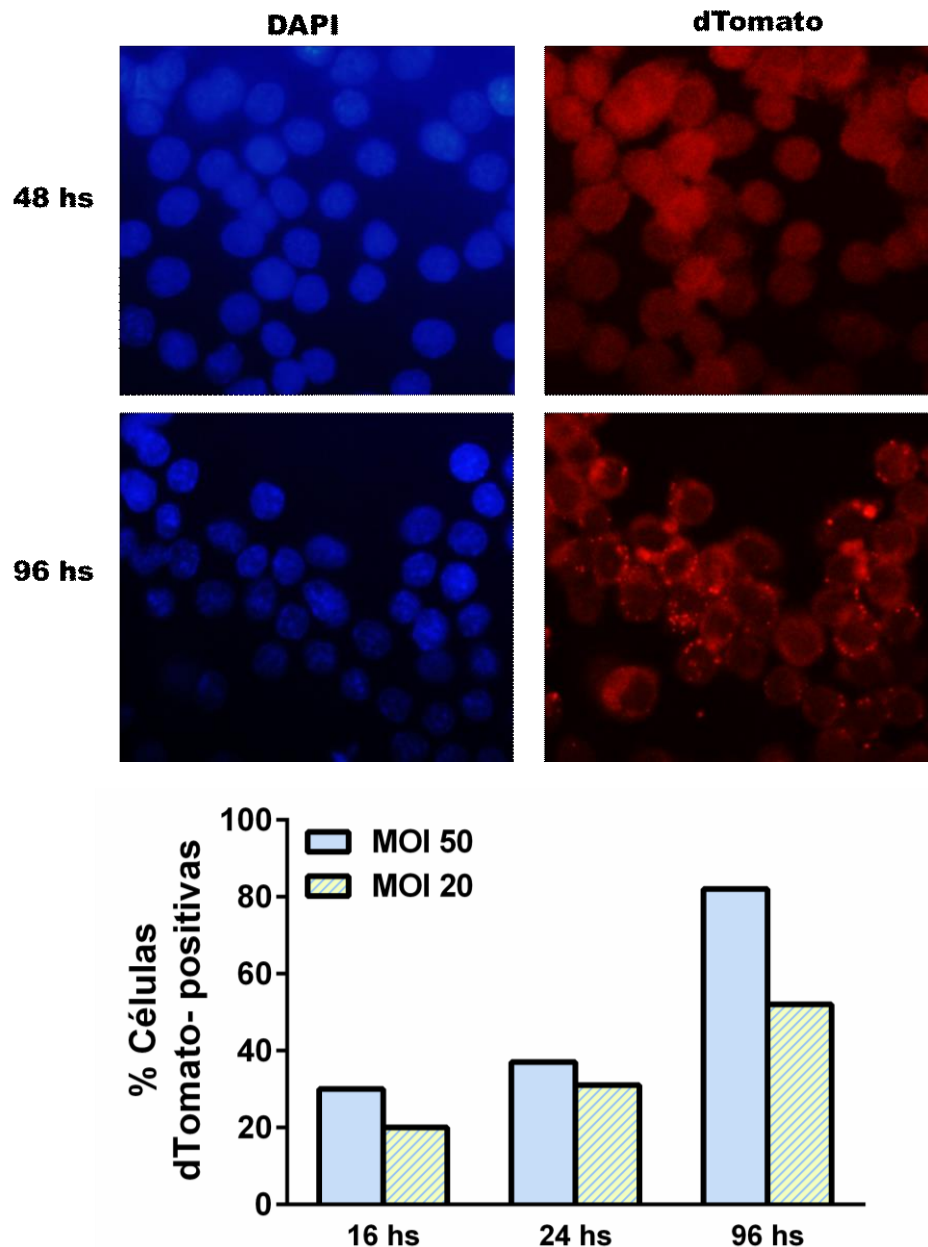


Figura IV. 10 Transducción de células GH3 con el baculovirus Ac-shHN. Microscopía de fluorescencia evidenciando la expresión de dTomato (panel superior). Cuantificación del número de células dTomato+ para estimar la eficiencia de la transducción (panel inferior).

Ensayos de funcionalidad utilizando los baculovirus Ac-shHN y Ac-sh(-)

Para determinar el efecto del silenciamiento de la HNr generado por la transducción mediada por los recBV, se evaluaron los niveles de apoptosis en células GH3 a distintos tiempos luego de la transducción con el baculovirus Ac-shHN y el baculovirus control. Luego de 48 hs. post transducción, la inhibición de la expresión de HNr produjo un aumento en la apoptosis de células GH3 en las células dTomato positivas (Figura IV.12).

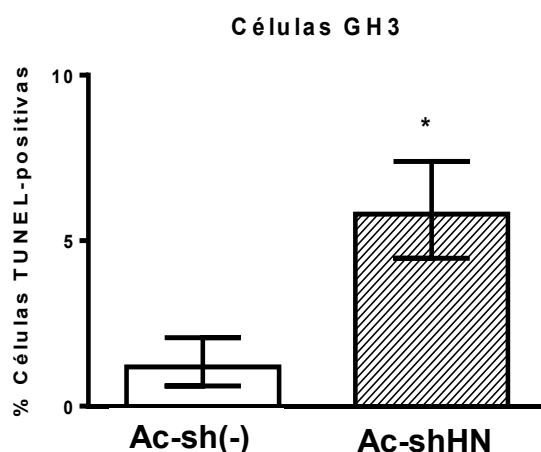


Figura IV. 11 Medición del número de células GH3 apoptóticas luego de ser transducidas con el baulovirus Ac-shHN o el baculovirus control mediante la técnica de TUNEL.

Ensayos *in vivo* en ratones *nude*.

Un total de 16 ratones *nude* fueron inoculados con una suspensión de 10^6 células tumorales GH3 con el objetivo de que desarrollen tumor. Se monitoreó la progresión tumoral en los en los animales y posteriormente los mismos fueron divididos en dos grupos experimentales iguales. Un grupo fue tratado con el baculovirus Ac-shHN y el otro con el baculovirus control Ac-sh(-). La Figura IV.13A muestra el incremento en el volumen de los tumores a lo largo del tiempo, iniciando el registro al momento de la inoculación con el baculovirus correspondiente. Puede observarse una tasa de crecimiento superior en el grupo de ratones tratados con el baculovirus control, aunque con mayor dispersión. Por su parte, en los ratones tratados con el baculovirus Ac-shHN puede observarse una velocidad inferior en la progresión tumoral y una diferencia en el volumen de los tumores que se vuelve significativa a los 14 días post inoculación (Figura IV.13A y 13B).

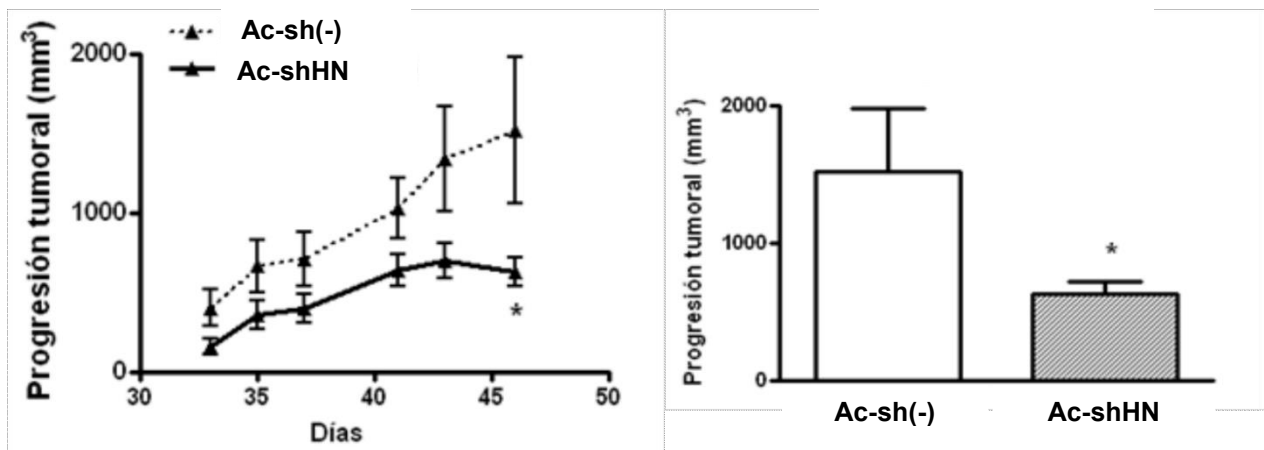


Figura IV. 12 Registro de la progresión del crecimiento tumoral (mm^3) en ratones *nude* con células GH3 implantadas tratados con el baculovirus control Ac-sh(-) o con el baculovirus Ac-shHN (panel izquierdo). Tamaño del tumor implantado (mm^3) en ratones tratados con ambos baculovirus respectivamente luego de 14 días lueo de la

En el estudio también se registró el nivel de sobrevida de los ratones pertenecientes a los dos grupos experimentales. La figura IV.14 muestra el porcentaje de ratones sobrevivientes durante el ensayo, observándose un 40% de sobrevida a los 75 días del ensayo en el caso de los ratones inoculados con el baculovirus Ac-shHN, mientras que en el caso de los ratones inoculados con el baculovirus control se observó un 100% de mortalidad a los 52 días del ensayo.

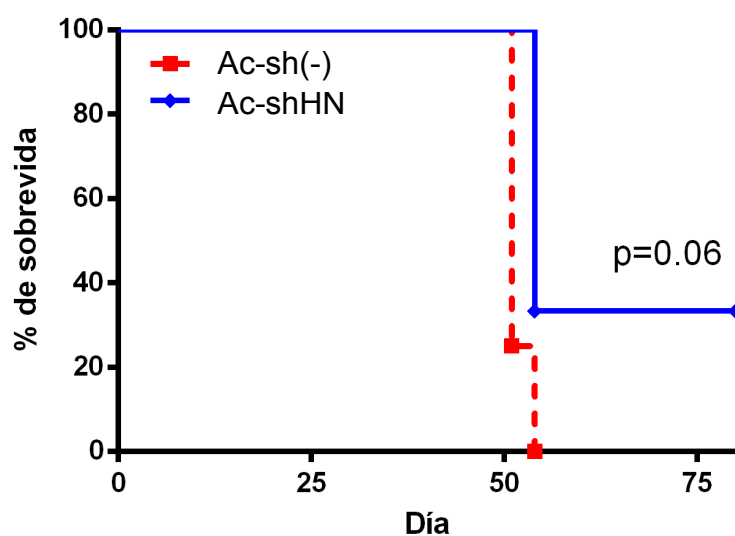


Figura IV. 13 Análisis de la sobrevida de los ratones con tumores implantados tratados con el baculovirus control Ac-sh(-) (rojo) y con el baculovirus Ac-shHN (azul).

Discusión

Nuestros resultados muestran que la HNr actuaría como un factor antiapoptótico en células GH3 y que su inhibición incrementa significativamente los niveles de apoptosis en este tipo celular tumoral. Al suministrar conjuntamente el vector que expresa el RNA de interferencia con TNF- α pudimos observar que el efecto pro-apoptótico del TNF- α se vió potenciado en los cultivos celulares previamente transfectados con el plásmido portador del shRNA. Dicho de otro modo, la HNr endógena podría estar interfiriendo en la apoptosis inducida por TNF- α y su silenciamiento permitiría que se ponga de manifiesto de forma más notoria el efecto de esa interleuquina. Sin embargo, el mecanismo de acción por el que HNr inhibe la apoptosis inducida por TNF- α sería compleja y podría implicar múltiples vías [147].

Cuando se utilizaron los recBV para la transducción de las células GH3 se confirmaron los resultados previamente obtenidos con la transfección plasmídica. De hecho, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células dTomato positivas, indicador de que la eficiencia de transducción superó notablemente a la eficiencia de transfección. Asimismo, los niveles de expresión de la proteína dTomato fueron significativamente más elevados, al punto de poder observarse cúmulos de proteína fluorescente a las 96 horas post transducción. Estos resultados constituyen en sí mismos un hallazgo muy importante dado que a la actualidad no se encontraba reportada en la bibliografía la capacidad transductora del baculovirus AcMNPV en células tumorales de adenohipófisis.

El análisis de funcionalidad realizado por TUNEL mostró que el baculovirus Ac-shHN fue capaz de inducir niveles de apoptosis en células GH3 hasta 3 veces superiores en relación al baculovirus control, demostrando que AcMNPV es capaz de vehiculizar eficientemente el RNA de interferencia.

Finalmente, los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* mostraron que la inhibición de la HNr endógena tiene un efecto significativo en la progresión de los tumores pituitarios en el modelo de tumores implantados en ratones *nude* desprovistos de sistema inmunológico. Este modelo resultó de gran utilidad para poder medir los efectos del silenciamiento de la HNr endógena en el desarrollo de la patología tumoral sin la posible interferencia del sistema inmune y del efecto

adyuvante intrínseco del vector baculoviral utilizado. El shRNA diseñado mostró una fuerte actividad pro-apoptótica en cultivos celulares y AcMNPV resultó ser un excelente vector para este tipo tumoral mostrando altos niveles de expresión y conduciendo a una progresión tumoral marcadamente más lenta y una mayor sobrevida.

Estos resultados podrían ayudar a diseñar terapias que utilicen HN como un objetivo potencial para el tratamiento alternativo de los tumores hipofisarios y al baculovirus AcMNPV como vector para terapia génica.

En la actualidad se utilizan en fase experimental diferentes vectores virales para terapia génica de cáncer y otras patologías. Independientemente de las diferencias en las eficiencias de *delivery* de genes la inmunidad pre-existente constituye el obstáculo más importante que cualquier vector debe sortear. En el caso de los adenovirus, por ejemplo, la inmunidad pre-existente es tan fuerte y tan difundida en la población que muchos de los ensayos clínicos han fracasado y la utilización de muchos de los vectores desarrollados ha quedado relegada sólo a órganos inmuno privilegiados donde la presión del sistema inmune es menor [149, 150]. Los baculovirus, por su parte, si bien son altamente inmunogénicos, no suelen exhibir este inconveniente dado que los seres humanos no solemos presentar inmunidad pre-existente específica [77, 144]. Esta ventaja por sobre otros vectores virales de terapia génica convierte a los baculovirus en una herramienta prometedora para futuros ensayos clínicos.

Gracias a que el diseño de la secuencia shRNA que expresa el baculovirus recombinante obtenido reconoce tanto el mRNA de HN humano como el de rata, ha sido posible su uso en otros proyectos de colaboración que involucran otros tipos tumorales como por ejemplo líneas tumorales derivadas de cáncer de mama y de gliomas obteniéndose resultados muy alentadores tanto *in vitro* como *in vivo*, confirmando que la HN es un excelente candidato para la terapia anti tumoral y que el baculovirus AcMNPV es un vector muy eficiente para el *delivery* y el silenciamiento de genes.

Capítulo V

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

El presente trabajo doctoral apuntó a la explotación de los baculovirus en diferentes aplicaciones vinculadas con la salud humana.

En primer lugar, se utilizó **la plataforma de expresión de proteínas recombinantes en células de insecto** mediada por AcMNPV para expresar la proteína GPC de JUNV.

Las **glicoproteínas de superficie** derivadas de GPC son responsables de la interacción de la partícula viral con la célula hospedadora y de mediar el ingreso a la misma. Por tal motivo, el desarrollo de alternativas vacunales seguras que apunten a generar inmunidad específica contra dicha proteína resulta de gran interés. En ese contexto, se generó un baculovirus recombinante capaz de expresar en cultivo celular de insecto la proteína GPC incorporando las glicosilaciones correctas, pero con procesamiento incompleto. El péptido señal de GPC, SSP, fue reconocido en el sistema de expresión de células de insecto, direccionando la glicoproteína a la membrana plasmática celular.

Las células infectadas con el baculovirus Ac-GPC permitieron **detectar** la presencia de **anticuerpos específicos para JUNV** en plasma o suero de pacientes de FHA usando formatos de inmunofluorescencia indirecta o de ELISA.

Además, **Ac-GPC resultó inmunogénico**: al inocular ratones BALB/c con BV pudo observarse la generación de anticuerpos específicos contra JUNV.

En segundo lugar, con el objetivo de desarrollar una **plataforma para la exposición superficial de antígenos**, se generó un sistema que permite obtener baculovirus recombinantes que exponen versiones de la proteína GP64 fusionada a polipéptidos heterólogos.

Para comprobar el funcionamiento de los vectores desarrollados tomamos como objeto de estudio la glicoproteína de superficie G1 de JUNV. Así, se generaron dos baculovirus recombinantes con la capacidad de expresar diferentes porciones de la proteína G1 de JUNV en fusión con GP64.

Se identificó, por métodos bioinformáticos, un péptido que sería responsable de la interacción de la proteína G1 de JUNV con su receptor celular. La utilización de los BV de los recBV **Ac-G1Dis** y **Ac-G1PD** en ensayos *in vivo* reveló que ambos virus inducen la generación de anticuerpos específicos contra JUNV.

Paralelamente, se desarrollaron vectores que permitieron la generación de **baculovirus con capacidad transductora en células de mamífero**. Esto fue evaluado con el baculovirus Ac-ie1GPC y su capacidad transductora se evidenció por *Western Blot* y citometría de flujo.

En ensayos *in vivo* inoculando ratones BALB/c con **Ac-ie1GPC** pudo observarse la generación de **inmunidad celular específica contra JUNV**. Cultivos de esplenocitos provenientes de ratones inoculados con dicho baculovirus y pre-estimulados con JUNV inactivado mostraron actividad citotóxica específica al inducir mayores niveles de apoptosis en cultivos celulares con expresión superficial de la proteína GPC.

En función de los resultados alentadores obtenidos, se planea completar el estudio con la inoculación de los virus recombinantes Ac-GPC, Ac-G1Dis, Ac-G1PD y Ac-ie1GPC en modelos animales adecuados y el posterior desafío con el agente etiológico. En base a estos estudios se diseñará el desarrollo y evaluación de una alternativa a la vacuna que se suministra actualmente, pudiendo alcanzar de ese modo a poblaciones de riesgo que en la actualidad no pueden ser inmunizadas con una vacuna a virus vivos atenuados.

Finalmente, en este trabajo exploramos la capacidad de los baculovirus de transducir células de mamífero a través de su utilización como **vector de terapia génica**. Para abordar este objetivo tomamos como objeto de estudio al péptido pequeño humanina (HN) y su rol en la citoprotección de células tumorales adenohipofisiarias.

Se diseñó un RNA de interferencia específico de HN y de su análogo en rata HN_r capaz de regular negativamente la expresión de la misma y de revertir su efecto anti-apoptótico en células tumorales GH3. Se realizaron ensayos de expresión transitoria empleando un vector plasmídico y se observó que el shRNA fue funcionalmente activo.

Posteriormente, se obtuvo un recBV denominado Ac-shHN capaz de vehiculizar el shRNA y al utilizarlo para la transducción de las células GH3 se confirmaron los resultados previamente obtenidos con transfección plasmídica y se observó que **la eficiencia de transducción superó notablemente a la eficiencia de transfección**.

Ac-shHN fue capaz de inducir niveles de apoptosis en células GH3 hasta 3 veces superiores en relación a un baculovirus control.

Finalmente, los resultados obtenidos en ensayos *in vivo* mostraron que la inhibición de la HNr endógena tuvo un **efecto significativo en la progresión de los tumores pituitarios**.

Por otra parte, el baculovirus **Ac-shHN** ha sido utilizado también en otros proyectos de colaboración que involucran **otros tipos tumorales**.

Estos resultados podrían ayudar a diseñar terapias que utilicen HN como un blanco potencial para el tratamiento alternativo de tumores hipofisarios y de otros tipos tumorales empleando al baculovirus AcMNPV como vector para terapia génica.

En conclusión, el baculovirus AcMNPV fue utilizado de forma exitosa en diferentes aplicaciones relacionadas con la salud humana y constituye una herramienta poderosa para la expresión de proteínas heterólogas, para el *delivery* de antígenos y de genes tanto para la prevención como para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades.

Perspectivas

- Profundizar la caracterización de la respuesta inmune desarrollada por los recBV Ac-GPC, Ac-G1Dis, Ac-G1PD y Ac-ie1GPC.
- Confirmar la exposición superficial de los antígenos de interés en el caso de Ac-G1Dis y Ac-G1PD.
- Realizar desafíos con JUNV en un modelo animal susceptible luego de la inmunización con cada recBV y combinaciones de los mismos.
- En función de los resultados obtenidos en el desafío, contemplar la posibilidad del escalado para la producción de inóculos y su transferencia al sector de Salud Pública.
- Confirmar el efecto del shRNA específico de HN y HNr por qPCR cuantificando los niveles del mRNA de HNr y del rRNA 16S mitocondrial.
- Repetir los ensayos de progresión tumoral *in vivo* y analizar si existe difusión del recBV fuera del sitio de inoculación en el tumor implantado.
- Probar el recBV Ac-shHN en otros modelos animales con sistema inmunológico activo y evaluar la capacidad inmunogénica intrínseca de los baculovirus en sumatoria con la regulación negativa de HN.

Capítulo VI

Materiales y métodos

Materiales

Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (La Jolla, USA), Promega (Madison, USA), New England Biolabs (Beverly, USA) y Gibco BRL-Life Technologies (Grand Island, USA). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Thermo-Fischer / Life Sciences / Invitrogen (Grand Island, USA) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (EE.UU.). Las fotografías se obtuvieron con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak digital science) o capturador de imágenes Epichemi3 Darkroom (UVP Bioimaging Systems). Para la toma de imágenes se utilizó un scanner VistaScan 240. La cuantificación de muestras se realizó por medidas de absorbancia; con el programa LabWorks™ 4.6 (Image Acquisition and Analysis Software) o con Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. Algunos plásmidos fueron recibidos de Clontech Laboratories / Takara Bio; otros fueron gentilmente cedidos por colegas. En particular, se agradece la gentileza del Dr. Jeon-Ho Je (Seul, Corea del Sur) por compartir con nosotros el bácmido bAcGOZA y el plásmido pBacPAK9.

Soluciones

Todas las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración con filtro de diámetro de poro de 22 µm. El agua utilizada en las soluciones fue bidestilada, filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave.

Soluciones para la extracción de plásmidos

Alcoholes: etanol 96% y 70%.

Solución I: glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH=8) EDTA 1 mM

Solución II: NaOH 0,2 N; SDS 1%

Solución III: acetato de potasio (KAcO) 5M, pH=4,8 (5M acetato)

Buffer TE: Tris•HCl 10 mM (pH=8) EDTA 1 mM

Acetato de sodio (NaAcO) 3 M: se pesó 246,1 gramos de NaAcO y se disolvió en agua bidestilada. Se llevó a pH 5,2 con ácido acético glacial y se añadió agua hasta llegar a un volumen final de 1 L.

Cloroformo : alcohol isoamílico (24:1): 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico.

Fenol: fenol equilibrado con fase acuosa a pH 8

Soluciones de antibióticos

Los antibióticos se disolvieron en agua bidestilada estéril a una concentración final de 100 mg/ml y se esterilizaron por filtración.

Soluciones para la resolución de ácidos nucleicos mediante electroforésis

Buffer de corrida TAE (Tris-HCl, ácido acético, EDTA) 50 X: 242 Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial y 100 mM EDTA 0,5 M pH=8,0. Completado a 1 L con agua.

TAE 1X: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

Solución Stock Bromuro de etidio: 10 mg/ml BrEt, conservado en oscuridad.

Geles de agarosa: agarosa 0,3% - 2% en buffer TAE 1X.

Solución de siembra: TAE 1X, glicerol 30% y colorantes xilen cianol FF y azul de bromofenol.

Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Gel separador: 18, 12, ó 10%, dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida : bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* de separación 1 X (Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8; SDS 0,1%). Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Agregar luego de desaerear la solución de acrilamida:bis inmediatamente antes de la verter la solución entre las placas de vidrio ensambladas del equipo (en nuestro caso: MiniPortean II, BioRad)

Gel concentrador: 5%. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* concentrador 1 X (Tris·HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 0,1%). Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Buffer de corrida 1 X: Tris base 25 mM; glicina 250 mM, pH 8,3; SDS 0,1%

Solución para siembra de muestras 4 X: Tris-HCl 200 mM, pH 6,8; glicerol 40,0%; SDS 8,0%; β-mercaptoetanol 8,0%; azul de bromofenol 0,4%

Solución de tinción: *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,25% p/v; metanol 45% v/v; ácido acético 10% v/v; Se lleva a 100 ml con H₂O.

Solución de decoloración: etanol 30% v/v; ácido acético 10% v/v.

Soluciones utilizadas en reacciones enzimáticas:

Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el DNA a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el buffer de digestión, la cantidad de enzima y el tiempo y temperatura de incubación recomendados por el proveedor. Los volúmenes de digestión variaron con la masa de DNA digerido de 5 µl a 100 µl.

Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas la cepa de *Escherichia coli* DH5αTM y TOP10, que posee los siguientes genotipos:

DH5αTM: F- φ80/*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17* (rk-, mk+) *phoA* *supE44* λ- *thi-1* *gyrA96* *relA1* *tonA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

TOP10: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *ara*Δ139 Δ(*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ- *rpsL*(StrR) *nupG* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Medios para cultivo de bacterias

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1 litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Para preparar medios sólidos se agrega 15 g de ágar por cada litro de medio líquido.

Antibióticos para cultivo de bacterias

Ampicilina: se disuelven 100 mg de ampicilina sódica en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Medios para cultivo de células de insectos

Grace's, Thermo-Fischer / Life Sciences / Invitrogen (Grand Island, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina) y gentamicina (50 µg/ml).

Antifúngicos y Antibióticos para cultivo de células

Anfotericina B: se disuelven 2,5 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Gentamicina: se disuelven 50 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Animales

Todos los experimentos con animales fueron de acuerdo a la ley 14346 de la República Argentina “*Malos tratos y actos de crueldad a los animales*”.

Todos los animales recibieron comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron acordes a los principios éticos vigentes para el trato de animales de experimentación y los protocolos, autorizados por Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) y de la Facultad de Medicina (UBA).

Métodos

Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979).

Se cultivaron bacterias *E. coli* (DH-5α o TOP10) en medio LB a 37°C con agitación (200 rpm) hasta saturación con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 1,5 ml de estos cultivos a 14000-18000 x g durante 30 segundos en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió cinco veces rellenando el mismo Eppendorf. Se añadieron 200 µl de Solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con vórtex. Luego se agregaron 400

µl de Solución II. Después se invirtió suavemente el tubo 5 a 10 veces o hasta observar la clarificación de la suspensión y se incubó en agua-hielo durante 5 min. Luego se neutralizó el pH con 300 µl de Solución III (a 4 °C) y se incubó durante 2-5 min en agua-hielo. El tubo Eppendorf se centrifugó 5 minutos a 14.000-18.000 x g a 4°C y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) evitando tomar el precipitado de DNA cromosómico, restos celulares y proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNA celulares de esta solución se degradaron por incubación con RNAsa A (20 µg/ml) durante 30 min a 37°C. El DNA plasmídico se aisló de las proteínas por dos extracciones sucesivas con fenol y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se concentró por precipitación etanólica (2-2,5 volúmenes) o con isopropanol (1 volumen). La preparación plasmídica se purificó luego con polvo de sílice.

Precipitación de ácidos nucleicos

Los DNA virales fueron precipitados mediante la adición de 0,1 volúmenes (vol) de NaAcO 3 M más 2,5 volúmenes de etanol 96%. Alternativamente, se precipitaron los DNA por adición de 0,3 vol de NaAcO 3 M más 0,6-1,0 volúmenes de alcohol isopropílico. En cualquiera de los dos protocolos, las soluciones se centrifugaron a 14.000 x g y 4 °C durante 30 min. Las sales fueron lavadas con solución de etanol 70%, preparado con agua bidestilada estéril. El sedimento se secó a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Electroforesis en geles de agarosa

Se pesó agarosa en un frasco de vidrio, se añadió buffer TAE (con bromuro de etidio 0,5 µg/ml) y se calentó en horno microondas hasta disolución de la agarosa en el buffer. Una vez que la agarosa se enfrió, pero aún se encontraba en estado líquido, se vertió un volumen conveniente sobre un molde acrílico con un peine para generar las calles de siembra de muestra. Una vez gelificada la agarosa, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con buffer TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con *buffer* de muestra y se depositaron dentro de las calles del gel. Los DNA se resolvieron aplicando un voltaje entre 80-120 V en caso que los tamaños de los fragmentos fueran pequeños o de 50-70 V para fragmentos grandes y en geles de menor concentración (0,3- 0,6%). Las electroforesis se realizaron en aparatos BIO-RAD. Los DNA se visualizaron por

transiluminación con luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, EE.UU. o Stratagen, EE.UU.) y las imágenes se capturaron con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science).

Purificación de fragmentos de DNA por adsorción a polvo de sílice

Los fragmentos de DNA o de productos de amplificación, se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (Geneclean Bio 101 Inc.). Se extrajo la porción del gel conteniendo la banda de interés y se incubó en 3 volúmenes de Nal saturado durante 5 min a 60°C. Posteriormente, se resuspendió con 20 µl de polvo de sílice (previamente resuspendido) y se incubó con agitación durante 5 min. La solución fue centrifugada durante 10 segundos a 14-18.000 X g. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado con 200 µl de solución New Wash (NaCl, etanol y agua), este paso se repitió 2 veces. Este precipitado fue secado durante 5 min a temperatura ambiente y luego resuspendido en una cantidad conveniente de agua bidestilada. Se centrifugó 30 seg a 14-18.000 X g y el sobrenadante con el DNA de interés se transfirió a otro tubo que fue conservado a -20 °C hasta su uso. El protocolo anterior fue adaptado para la purificación de minipreps. En este caso, se agregaron 3 volúmenes de Nal a la solución III de miniprep y 20 µl de polvo de sílice, siendo el resto de los pasos iguales.

Preparación de bacterias *E. coli* electrocompetentes

Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5α hasta saturación. Ese cultivo se diluyó 1/20 en medio LB sin NaCl (1.000 ml) y se cultivó a 37 °C con agitación de 180-220 rpm hasta alcanzar 0,5 a 0,6 unidades de densidad óptica a 600 nm. En este punto, el cultivo se enfrió en agua hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 2800xg durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 500 ml de glicerol 10% (v/v) preparado en agua bidestilada estéril. El proceso de resuspensión y centrifugación se repitió dos veces, disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados, reuniendo los sobrenadantes resuspendidos de dos recipientes en uno. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10%, se separaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80 °C hasta el momento de su uso.

Transformación de *E. coli* por electroporación

La transformación de bacterias electrocompetentes se realizó en un electroporador Gene Pulser TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se mezclaron 50 µl de bacterias electrocompetentes con 2 µl reacción de ligación. Esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm de distancia entre los electrodos y la mezcla se sometió a un pulso de 2,2 kV. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 µF y 200 ohm (Ω), respectivamente. Inmediatamente luego del pulso eléctrico, se añadió 1 ml de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h a 37 °C con agitación. Se sembraron 200 y 300 µl de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (ampicilina 100 µg/ml). Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

Colony PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de las diferentes transformaciones y se estrilaron en una placa de agar LB con el antibiótico. El remanente de bacterias en el palillo fue depositado en un tubo *ependorf* con agua estéril, reuniendo hasta 10 colonias en cada tubo. Los tubos *ependorf* fueron incubados en un baño de agua a 100°C durante quince minutos, para provocar la lisis celular y liberación del DNA plasmídico. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 5 min. Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descritas anteriormente, utilizando 1 µl del sobrenadante como molde en 10 µl de volumen final y empleando los *primers* correspondientes. Los *pooles* que presentaron una señal positiva por PCR fueron analizados en una *colony* PCR individual, con una colonia por tubo, a partir de las estrías del proceso anterior.

Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA fueron llevadas a cabo en los cicladores térmicos Eppendorf (Mastercycler Gradient) y Thermo (PCR Sprint). Las reacciones en las que se iba a utilizar el producto de amplificación para clonación se utilizó la DNA polimerasa Taq (Embiotec) si el producto era menor a 1000 pb. En las reacciones de caracterización se usó la misma polimerasa. La mezcla de reacción fue diseñada de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes la enzima, variando únicamente la concentración de MgCl₂. Para la clonación de productos de más de 1000 pb se utilizó la enzima Long Taq (Dongsheng Biotech Co., Ltd.),

siguiendo las recomendaciones del fabricante y variando la concentración de MgCl₂ y *enhancer*.

Mantenimiento de células

Las células High Five™ (BTI-TN-5B1-4) y Sf9 se mantuvieron a 27°C en medio Grace's (Invitrogen™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser) y 50 µg/ml de gentamicina (Parafarm).

Congelamiento

Para el congelamiento se partió de monocapas de células confluentes de frascos T25. Se extrae el medio de cultivo y se agregan 5 ml de medio Grace's conteniendo 10% SFB y 10% DMSO. Se suspendieron las células mecánicamente y se alicuotaron en criotubos de polipropileno de 2 ml. Luego se procedió a un congelamiento graduado hasta -80°C, colocando los criotubos en contacto con una suspensión de etanol o glicerol.

Transfecciones

Como reactivo de transfección se utilizó Cellfectin o Cellfectin II (Invitrogen™). Se utiliza el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, para la transfección de una placa de 10 cm² se realizó una mezcla de DNA a transfectar con 200 µl de medio sin suero y otra mezcla de 5 µl de Cellfectin y 200 µl de medio sin suero. Las mezclas de DNA y Cellfectin se mezclaron por goteo suave y se esperó 15 minutos (Cellfectin II) o 30 minutos (Cellfectin) para permitir la formación de complejos DNA-Reactivo de transfección. Se retiró el sobrenadante de la placa de cultivo a transfectar y se lavó 3 veces con medio sin suero. Finalmente, se goteó suavemente la mezcla de transfección sobre la placa. Luego se agregaron 400 µl adicionales de medio sin suero para completar el volumen mínimo de medio requerido por la placa para la supervivencia de las células. Al día siguiente se extrajo el medio de transfección y se agregaron 2 ml de medio completo.

Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular

Para el mantenimiento de virus en cultivo celular, se siguieron los protocolos sugeridos en los libros de referencia "*Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*" [151] y "*Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*" [152].

Extracción fenólica para obtención del DNA viral y del bácmido

Este método se empleó para separar proteínas de soluciones de ácidos nucleicos de preparaciones de viriones de los recBV tratados con proteinasa K y de lisados bacterianos que contenían el bácmido bAcGOZA. El DNA se extrajo con un volumen de fenol para eliminar proteínas. Una vez añadida la solución orgánica al tubo, se mezcló suavemente por inversión durante 10 min y se centrifugó durante 5 min a 14-18000 x g y se tomó la fase acuosa cuidando de no extraer material de la interfase. El procedimiento se repitió con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Inmunofluorescencia

Las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, seguido de lavados con PBS 1X, o en su defecto con solución fisiológica. El bloqueo de sitios no específicos se realizó incubando 20 min a TA con buffer de bloqueo (PBS-T 2% SFB). Los vidrios fueron incubados con los respectivos antisueros (conejo anti-elastasa Calbiochem-Merk Millipore Darmstad, Alemania), usualmente en una dilución 1:100 en buffer de bloqueo por 1 h a TA, seguido de lavados, e incubaciones con anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos. Los núcleos celulares se tiñeron con ioduro de propidio o DAPI. Finalmente, los preparados fueron montados con polymount y cubreobjetos para ser observados con posterioridad en un fotomicroscopio Nikon E200.

Aislamiento de esplenocitos

Para el aislamiento de esplenocitos, en condiciones de esterilidad, se colectaron los bazo de los animales al finalizar el experimento (14 dpi) en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (RPMI-10). Los esplenocitos se extrajeron presionando los bazo contra una malla metálica sobre una caja de Petri con 1-2 ml de medio RPMI-10. Luego, la suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 ml y se llevó a 4 ml con el mismo medio. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C y se resuspendieron en 4 ml de cloruro de amonio 0,1 M para lisar los glóbulos rojos. La suspensión se mezcló con vortex unos segundos, se incubó en hielo durante 3-4 min, se completó con 10 ml de medio RPMI-10 y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C. El sobrenadante se descartó y el procedimiento se repitió otra vez para asegurar la lisis completa de los eritrocitos. Finalmente, las células se lavaron

con el medio RPMI-10, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C y se resuspendieron en 500 µl del mismo medio. El recuento de los esplenocitos vivos se realizó en una cámara de Neubauer utilizando el colorante azul tripán, el cual ingresa sólo en las células no viables, dejando a las viables incoloras. Se realizaron suspensiones con una concentración de 10^7 células en 2 ml de medio RPMI-10, las cuales fueron estimuladas con 4×10^6 PFU de JUNV inactivado previamente con PFA 4%, en 100 µl del mismo medio.

ELISA

Se sembraron placas de 96 pocillos con células de insecto Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes (10^7 /ml) en buffer carbonato (pH 9.6) y se incubó *overnight* a 4°C. A continuación, la placa se bloqueó con 5% de leche descremada en PBS-T durante 1 hora a 37 °C para disminuir el pegado inespecífico. Luego de lavar la placa tres veces con PBS-T, se realizaron diluciones seriadas al medio de las muestras de suero (a partir de 1:16), incubando 2 horas a 37 °C. La placa se lavó tres veces con PBS-T y se incubó 1 hora a 37 °C con 50 µl de una dilución 1:2000 de IgG de cabra anti ratón biotinilados, seguidos de la incubación con estreptavidina conjugada con HRP 1:4000 (todos los anticuerpos se compraron en Sigma). Finalmente, se lavó nuevamente tres veces con PBS-T y se reveló con 1 mg/ml de o-fenilendiamina (OPD) en *buffer* citrato-fosfato pH 5 (24,3% ácido cítrico 0,1M, 25,7% fosfato disódico 0,2M), más 1 µl/ml de agua oxigenada 30 volúmenes. La reacción prosiguió durante 15-20 min y se detuvo agregando 50 µl de ácido sulfúrico 4N en cada pocillo. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (TP-reader, Thermo) contra la absorbancia de controles.

Oligonucleótidos

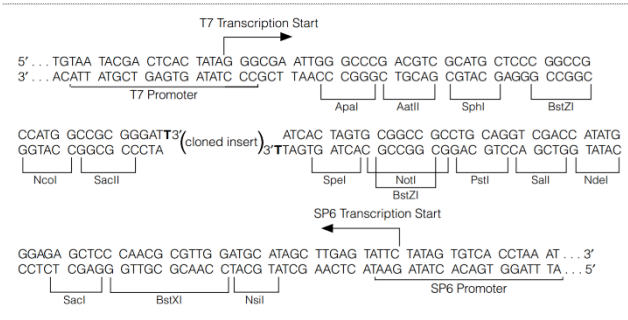
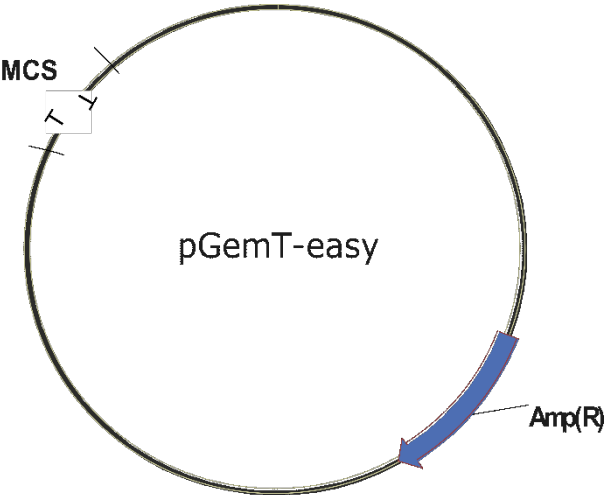
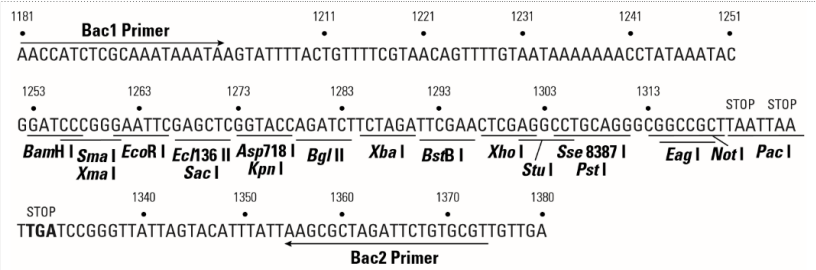
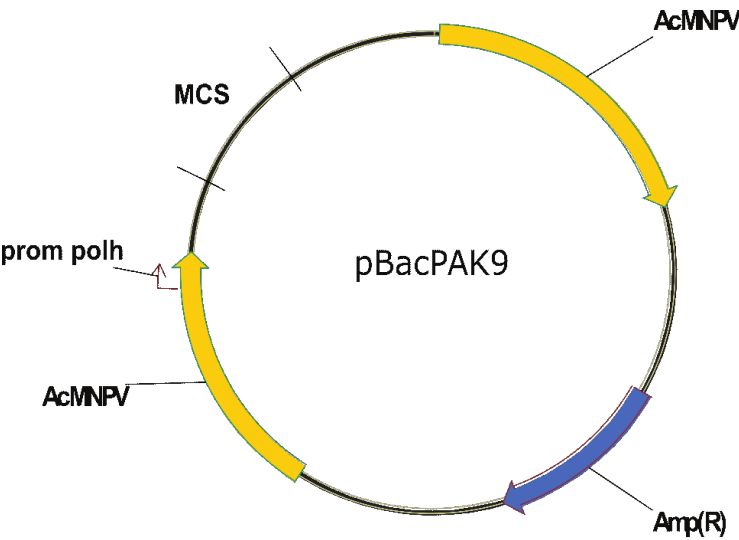
Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'a 3'
<i>gp64Fw</i>	TATATGAGCTCAAGGTTGTGAGTTCAAGTCTC
<i>gp64Rv</i>	GACCTGATATCAAGGGTGTAATACTCTTTA
<i>ins1Fw</i>	GTCACCTAAGCTTCCCGGGATGCTACTAGTAAATCAGTCAC
<i>ins1Rv</i>	GTCACCTAAGCTTTCTAGATGAGGCATCTTATATACCC
<i>ins2Fw</i>	GTCACCTGGTACCGAATTCGCGGAGCACTGCAACGCGC
<i>ins2RV</i>	GTCACCTGGTACCGCTAGCTTTTCGCAAAGGCAGAATGCGCCGCCG
<i>g1Fw</i>	CATGAATTCGAAGAAGCTTTTAAAATC
<i>g1Rv</i>	CATGAATTCTAAAGACCTCCTTGGAAGC
<i>g1pdFw</i>	CATGCTAGCGGTACCAACAAGAGCCATCTTTAC
<i>g1pdRv</i>	CATGAATTCGGTACCTATAACGTCATATTCTGG
<i>egfpFw</i>	CATGAATTCGGTACCATGGTGAGCAAGGG
<i>egfpRv</i>	CATGAATTCGGTACCCTTGTACAGCTCGTC
<i>promie1Fw</i>	GTGAAGATCTGGCCAGATATACGCGTTGAC
<i>promie1Rv</i>	GTGAAGATCTGCCAGTAAGCAGTGGGTTC

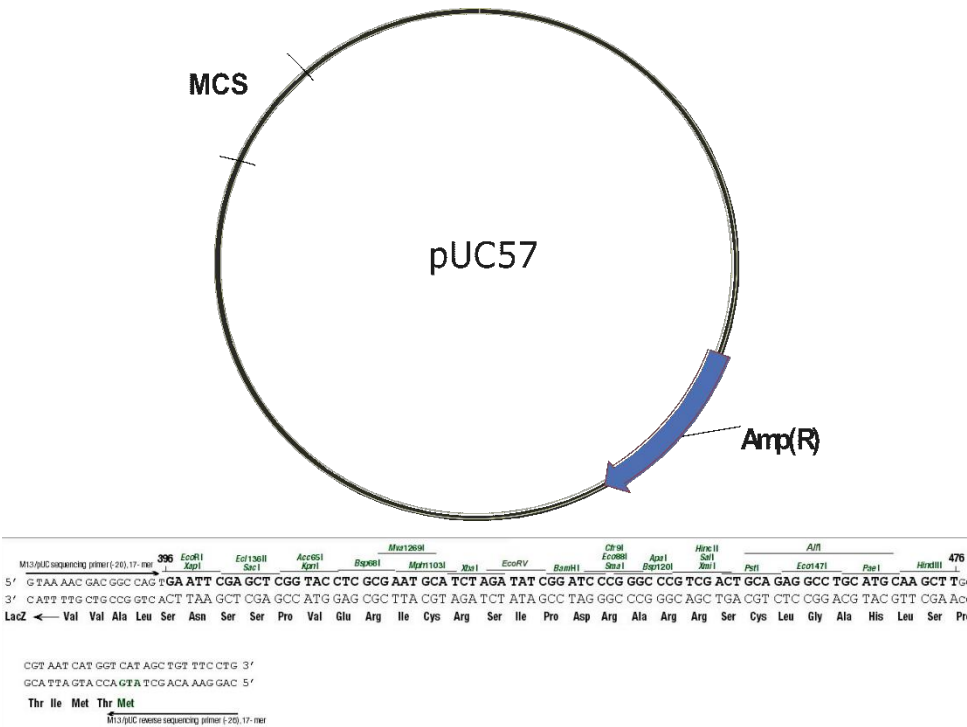
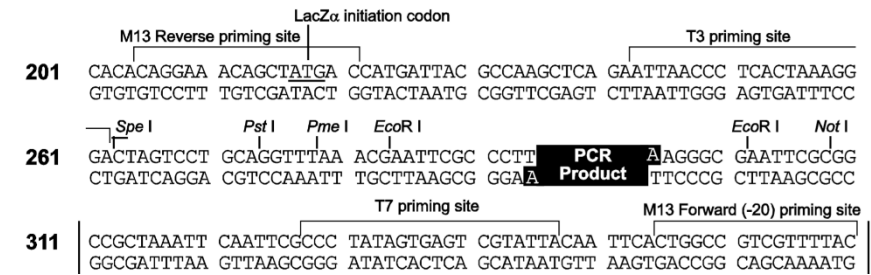
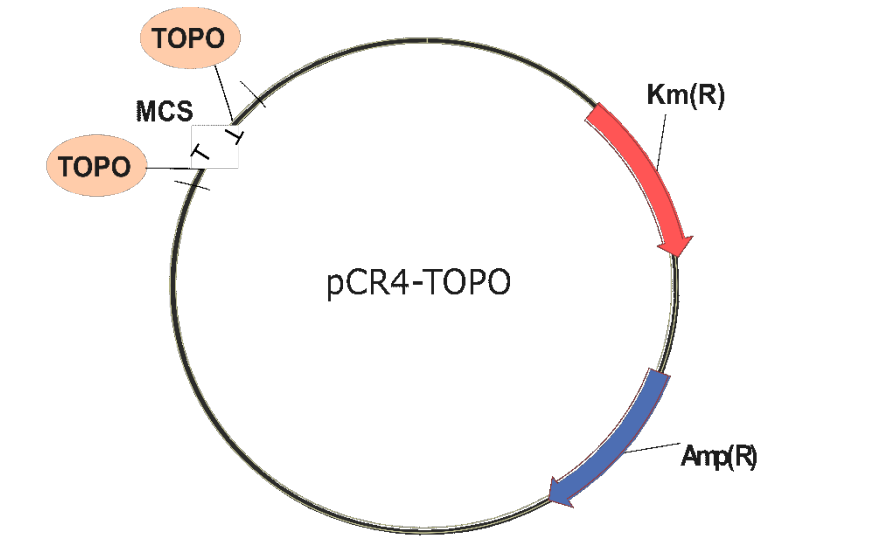
Tabla VI. 1 Oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR.

Análisis estadístico

En los gráficos de barras, los datos han sido expresados como promedio \pm error estándar de la media o SEM (del inglés, *standard error of the median*). Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba *t* de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, con posterior aplicación del test de comparación múltiple de Bonferroni, según correspondiera. El análisis de contingencia se realizó mediante el Test Exacto de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Mapas de vectores comerciales utilizados





Referencias

Referencias

1. Herniou, E.A., B.M. Arif, J.J. Becnel, G.W. Blissard, B. Bonning, R. Harrison, J.A. Jehle, D.A. Theilmann, and J.M. Vlak, *Baculoviridae*, in *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, M.J.A. A. M. Q. King, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz., Editor 2012, Elsevier Academic Press: San Diego. p. pp. 163-173.
2. Rohrmann, G.F., *Baculovirus Molecular Biology*, in *Baculovirus Molecular Biology* 2013: Bethesda (MD).
3. Haase, S., M.L. Ferrelli, M.L. Pidre, and V. Romanowski, *Genetic Engineering of Baculoviruses*, in *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*
- V. Romanowski, Editor 2013: InTech Open Access Publisher [<http://dx.doi.org/10.5772/55572>]
4. Jehle, J.A., G.W. Blissard, B.C. Bonning, J.S. Cory, E.A. Herniou, G.F. Rohrmann, D.A. Theilmann, S.M. Thiem, and J.M. Vlak, *On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision*. Arch Virol, 2006. **151**(7): p. 1257-66.
5. Jehle, J.A., M. Lange, H. Wang, Z. Hu, Y. Wang, and R. Hauschild, *Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera*. Virology, 2006. **346**(1): p. 180-93.
6. Theze, J., A. Bezier, G. Periquet, J.M. Drezen, and E.A. Herniou, *Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 15931-5.
7. Backovic, M. and T.S. Jardetzky, *Class III viral membrane fusion proteins*. Current Opinion in Structural Biology, 2009. **19**(2): p. 189-196.
8. Chisholm, G.E. and D.J. Henner, *Multiple early transcripts and splicing of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene*. J Virol, 1988. **62**(9): p. 3193-200.
9. Hoopes, R.R., Jr. and G.F. Rohrmann, *In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4513-7.
10. Pullen, S.S. and P.D. Friesen, *The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3575-83.
11. Pullen, S.S. and P.D. Friesen, *Early transcription of the ie-1 transregulator gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 156-65.
12. Romanowski, V. and P.D. Ghiringhelli, *Biología molecular de los baculovirus*, in *Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*, S.d.P.d.l.U.P.d.N.P. Universidad Pública de Navarra, Editor 2001: España.
13. Lee, H. and P.J. Krell, *Reiterated DNA fragments in defective genomes of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication*. Virology, 1994. **202**(1): p. 418-29.
14. Kool, M., J.T. Voeten, R.W. Goldbach, and J.M. Vlak, *Functional mapping of regions of the Autographa californica nuclear polyhedrosis viral genome required for DNA replication*. Virology, 1994. **198**(2): p. 680-9.
15. Leisy, D.J. and G.F. Rohrmann, *Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected Spodoptera frugiperda cells*. Virology, 1993. **196**(2): p. 722-30.

16. Pearson, M.N. and G.F. Rohrmann, *Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 213-21.
17. Lu, A. and L.K. Miller, *Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6265-72.
18. Pearson, M.N., R.M. Bjornson, C. Ahrens, and G.F. Rohrmann, *Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for Orgyia pseudotsugata*. Virology, 1993. **197**(2): p. 715-25.
19. Heldens, J.G., R. Broer, D. Zuidema, R.W. Goldbach, and J.M. Vlak, *Identification and functional analysis of a non-hr origin of DNA replication in the genome of Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 6): p. 1497-506.
20. Levin, D.B. and J. Huang, *Spodoptera littoralis type B nucleopolyhedrovirus infection of a grasshopper cell line*. J Invertebr Pathol, 1999. **74**(2): p. 184-92.
21. DePamphilis, M.L., *Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(3): p. 434-41.
22. Herniou, E.A., J.A. Olszewski, J.S. Cory, and D.R. O'Reilly, *The genome sequence and evolution of baculoviruses*. Annu Rev Entomol, 2003. **48**: p. 211-34.
23. Crouch, E.A. and A.L. Passarelli, *Genetic requirements for homologous recombination in Autographa californica nucleopolyhedrovirus*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9323-34.
24. Wu, Y., G. Liu, and E.B. Carstens, *Replication, integration, and packaging of plasmid DNA following cotransfection with baculovirus viral DNA*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5473-80.
25. Kool, M., C.H. Ahrens, J.M. Vlak, and G.F. Rohrmann, *Replication of baculovirus DNA*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 9): p. 2103-18.
26. Oppenheimer, D.I. and L.E. Volkman, *Evidence for rolling circle replication of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus genomic DNA*. Arch Virol, 1997. **142**(10): p. 2107-13.
27. Braunagel, S.C., J.K. Burks, G. Rosas-Acosta, R.L. Harrison, H. Ma, and M.D. Summers, *Mutations within the Autographa californica nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8559-70.
28. Quant-Russell, R.L., M.N. Pearson, G.F. Rohrmann, and G.S. Beaudreau, *Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies*. Virology, 1987. **160**(1): p. 9-19.
29. van Oers, M.M., J.T. Flipsen, C.B. Reusken, E.L. Sliwinsky, R.W. Goldbach, and J.M. Vlak, *Functional domains of the p10 protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 4): p. 563-74.
30. Vlak, J.M., A. Schouten, M. Usmany, G.J. Belsham, E.C. Klinge-Roode, A.J. Maule, J.W. Van Lent, and D. Zuidema, *Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method*. Virology, 1990. **179**(1): p. 312-20.
31. van Oers, M.M., G.P. Pijlman, and J.M. Vlak, *Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology*. J Gen Virol, 2015. **96**(Pt 1): p. 6-23.
32. Kost, T.A., J.P. Condreay, and D.L. Jarvis, *Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(5): p. 567-575.
33. Monsma, S.A. and G.W. Blissard, *Identification of a membrane fusion domain*

- and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein.* J Virol, 1995. **69**(4): p. 2583-95.
34. Zanutto, P.M., B.D. Kessing, and J.E. Maruniak, *Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations.* J Invertebr Pathol, 1993. **62**(2): p. 147-64.
35. Kadlec, J., S. Loureiro, N.G.A. Abrescia, D.I. Stuart, and I.M. Jones, *The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines.* Nature Structural & Molecular Biology, 2008. **15**(10): p. 1024-1030.
36. Grabherr, R. and W. Ernst, *Baculovirus for eukaryotic protein display.* Curr Gene Ther, 2010. **10**(3): p. 195-200.
37. Pidre, M.L., M.L. Ferrelli, S. Haase, and V. Romanowski, *Baculovirus display: a novel tool for vaccination,* in *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*, V. Romanowski, Editor 2013: InTech Open Access Publisher [<http://dx.doi.org/10.5772/55572>] p. pp 137-164.
38. Hervás-Stubbs, S., P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc, *Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN.* J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2361-9.
39. Han, Y., M. Niu, L. An, and W. Li, *Involvement of TLR21 in baculovirus-induced interleukin-12 gene expression in avian macrophage-like cell line HD11.* Veterinary Microbiology, 2010. **144**(1-2): p. 75-81.
40. Chimento Zoth, S., J.M. Carballada, E. Gómez, M.J. Gravisaco, E. Carrillo, and A. Berinstein, *Modulation of innate immunity in chickens induced by in vivo administration of baculovirus.* Veterinary Immunology and Immunopathology, 2012. **145**(1-2): p. 241-247.
41. Abe, T., H. Hemmi, H. Miyamoto, K. Moriishi, S. Tamura, H. Takaku, S. Akira, and Y. Matsuura, *Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus.* Journal of Virology, 2005. **79**(5): p. 2847-2858.
42. Abe, T., H. Takahashi, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, Y. Matsuura, and H. Takaku, *Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice.* J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1133-9.
43. Abe, T. and Y. Matsuura, *Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals.* Curr Gene Ther, 2010. **10**(3): p. 226-31.
44. Abe, T., Y. Kaname, X. Wen, H. Tani, K. Moriishi, S. Uematsu, O. Takeuchi, K.J. Ishii, T. Kawai, S. Akira, and Y. Matsuura, *Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner.* J Virol, 2009. **83**(15): p. 7629-40.
45. Gronowski, A.M., D.M. Hilbert, K.C. Sheehan, G. Garotta, and R.D. Schreiber, *Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells.* J Virol, 1999. **73**(12): p. 9944-51.
46. Kitajima, M., T. Abe, N. Miyano-Kurosaki, M. Taniguchi, T. Nakayama, and H. Takaku, *Induction of Natural Killer Cell-dependent Antitumor Immunity by the Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus.* Molecular Therapy, 2007. **16**(2): p. 261-268.
47. Xu, X.-G., M.-T. Chiou, Y.-M. Zhang, D.-W. Tong, J.-H. Hu, M.-T. Zhang, and H.-J. Liu, *Baculovirus surface display of Erns envelope glycoprotein of classical swine fever virus.* Journal of Virological Methods, 2008. **153**(2): p. 149-155.
48. Xu, X.-G. and H.-J. Liu, *Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model.* Vaccine, 2008. **26**(43): p. 5455-5460.
49. Xu, X.-G., D.-W. Tong, M.-T. Chiou, Y.-C. Hsieh, W.-L. Shih, C.-D. Chang, M.-

- H. Liao, Y.-M. Zhang, and H.-J. Liu, *Baculovirus surface display of NS3 nonstructural protein of classical swine fever virus*. Journal of Virological Methods, 2009. **159**(2): p. 259-264.
50. Xu, X.-G., Z.-S. Wang, Q. Zhang, Z.-C. Li, H.-N. Zhao, W. Li, D.-W. Tong, and H.-J. Liu, *Baculovirus surface display of E envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity of the displayed proteins in mouse and swine models*. Vaccine, 2011. **29**(4): p. 636-643.
 51. Lin, Y.H., L.H. Lee, W.L. Shih, Y.C. Hu, and H.J. Liu, *Baculovirus surface display of σ C and σ B proteins of avian reovirus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model*. Vaccine, 2008. **26**(50): p. 6361-6367.
 52. Meng, T., A.B. Kolpe, T.K. Kiener, V.T. Chow, and J. Kwang, *Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human enterovirus 71 strains in mice*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21757.
 53. Jin, R., Z. Lv, Q. Chen, Y. Quan, H. Zhang, S. Li, G. Chen, Q. Zheng, L. Jin, X. Wu, J. Chen, and Y. Zhang, *Safety and immunogenicity of H5N1 influenza vaccine based on baculovirus surface display system of Bombyx mori*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3933.
 54. Prabakaran, M., S. Madhan, N. Prabhu, J. Qiang, and J. Kwang, *Gastrointestinal Delivery of Baculovirus Displaying Influenza Virus Hemagglutinin Protects Mice against Heterologous H5N1 Infection*. Journal of Virology, 2010. **84**(7): p. 3201-3209.
 55. Yoshida, S., M. Kawasaki, N. Hariguchi, K. Hirota, and M. Matsumoto, *A Baculovirus Dual Expression System-Based Malaria Vaccine Induces Strong Protection against Plasmodium berghei Sporozoite Challenge in Mice*. Infection and Immunity, 2009. **77**(5): p. 1782-1789.
 56. Boublik, Y., P. Di Bonito, and I.M. Jones, *Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface*. Biotechnology (N Y), 1995. **13**(10): p. 1079-84.
 57. Spenger, A., R. Grabherr, L. Tollner, H. Katinger, and W. Ernst, *Altering the surface properties of baculovirus Autographa californica NPV by insertional mutagenesis of the envelope protein gp64*. Eur J Biochem, 2002. **269**(18): p. 4458-67.
 58. Tani, H., T. Abe, C.K. Limn, R. Mochizuki, J. Yamagishi, Y. Kitagawa, R. Watanabe, K. Moriishi, and Y. Matsuura, *[Baculovirus vector--gene transfer into mammalian cells]*. Uirusu, 2003. **53**(2): p. 185-93.
 59. Tani, H., M. Nishijima, H. Ushijima, T. Miyamura, and Y. Matsuura, *Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection*. Virology, 2001. **279**(1): p. 343-53.
 60. Barsoum, J., R. Brown, M. McKee, and F.M. Boyce, *Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(17): p. 2011-8.
 61. Pieroni, L., D. Maione, and N. La Monica, *In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(8): p. 871-81.
 62. Kitagawa, Y., H. Tani, C.K. Limn, T.M. Matsunaga, K. Moriishi, and Y. Matsuura, *Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3639-52.
 63. Mangor, J.T., S.A. Monsma, M.C. Johnson, and G.W. Blissard, *A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2544-56.
 64. Pieroni, L. and N. La Monica, *Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector*. Curr Opin Mol Ther, 2001. **3**(5): p. 464-7.

65. Duisit, G., S. Saleun, S. Douthe, J. Barsoum, G. Chadeuf, and P. Moullier, *Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells*. J Gene Med, 1999. **1**(2): p. 93-102.
66. Makkonen, K.E., P. Turkki, J.P. Laakkonen, S. Yla-Herttuala, V. Marjomaki, and K.J. Airene, *6-o- and N-sulfated syndecan-1 promotes baculovirus binding and entry into Mammalian cells*. J Virol, 2013. **87**(20): p. 11148-59.
67. Long, G., X. Pan, R. Kormelink, and J.M. Vlak, *Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8830-3.
68. Matilainen, H., J. Rinne, L. Gilbert, V. Marjomaki, H. Reunanen, and C. Oker-Blom, *Baculovirus Entry into Human Hepatoma Cells*. Journal of Virology, 2005. **79**(24): p. 15452-15459.
69. Laakkonen, J.P., M.U. Kaikkonen, P.H. Ronkainen, T.O. Ihalainen, E.A. Niskanen, M. Hakkinen, M. Salminen, M.S. Kulomaa, S. Yla-Herttuala, K.J. Airene, and M. Vihinen-Ranta, *Baculovirus-mediated immediate-early gene expression and nuclear reorganization in human cells*. Cell Microbiol, 2008. **10**(3): p. 667-81.
70. Chen, C.-Y., C.-Y. Lin, G.-Y. Chen, and Y.-C. Hu, *Baculovirus as a gene delivery vector: Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications*. Biotechnology Advances, 2011. **29**(6): p. 618-631.
71. Niu, M., Y. Han, and W. Li, *Baculovirus up-regulates antiviral systems and induces protection against infectious bronchitis virus challenge in neonatal chicken*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(12): p. 1609-15.
72. Schutz, A., N. Scheller, T. Breinig, and A. Meyerhans, *The Autographa californica nuclear polyhedrosis virus AcNPV induces functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. Vaccine, 2006. **24**(49-50): p. 7190-6.
73. Kukkonen, S.P., K.J. Airene, V. Marjomaki, O.H. Laitinen, P. Lehtolainen, P. Kankaanpaa, A.J. Mahonen, J.K. Raty, H.R. Nordlund, C. Oker-Blom, M.S. Kulomaa, and S. Yla-Herttuala, *Baculovirus capsid display: a novel tool for transduction imaging*. Mol Ther, 2003. **8**(5): p. 853-62.
74. van Loo, N.D., E. Fortunati, E. Ehler, M. Rabelink, F. Grosveld, and B.J. Scholte, *Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 961-70.
75. Salminen, M., K.J. Airene, R. Rinnankoski, J. Reimari, O. Valilehto, J. Rinne, S. Suikkanen, S. Kukkonen, S. Yla-Herttuala, M.S. Kulomaa, and M. Vihinen-Ranta, *Improvement in nuclear entry and transgene expression of baculoviruses by disintegration of microtubules in human hepatocytes*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2720-8.
76. Hu, Y.-c., *Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells*. Acta Pharmacologica Sinica, 2005. **26**(4): p. 405-416.
77. Hu, Y.C., *Baculovirus Vectors for Gene Therapy*. 2006. **68**: p. 287-320.
78. Merrihew, R.V., W.C. Clay, J.P. Condreay, S.M. Witherspoon, W.S. Dallas, and T.A. Kost, *Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 903-9.
79. Strauss, R., A. Huser, S. Ni, S. Tuve, N. Kiviat, P.S. Sow, C. Hofmann, and A. Lieber, *Baculovirus-based vaccination vectors allow for efficient induction of immune responses against plasmodium falciparum circumsporozoite protein*. Mol Ther, 2007. **15**(1): p. 193-202.
80. Bon, L. and C. Lucchetti, *Auditory environmental cells and visual fixation effect in area 8B of macaque monkey*. Exp Brain Res, 2006. **168**(3): p. 441-9.
81. Maiztegui, J.I., *Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever*, 1975, Bull . WHO. p. 385-575.

82. Lozano, M.E., D. Enria, J.I. Maiztegui, O. Grau, and V. Romanowski, *Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(5): p. 1327-32.
83. Moraz, M.-L. and S. Kunz, *Pathogenesis of arenavirus hemorrhagic fevers*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2011. **9**: p. 49-59.
84. Enria, D.A., A.M. Briggiler, and Z. Sanchez, *Treatment of Argentine hemorrhagic fever*. Antiviral Res, 2008. **78**(1): p. 132-9.
85. Enria, D., S.G. Franco, A. Ambrosio, D. Vallejos, S. Levis, and J. Maiztegui, *Current status of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever*. Med Microbiol Immunol, 1986. **175**(2-3): p. 173-6.
86. Maiztegui, J.I., N.J. Fernandez, and A.J. de Damilano, *Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome*. Lancet, 1979. **2**(8154): p. 1216-1217.
87. Mills, J.N., B.A. Ellis, J.E. Childs, K.T. McKee, Jr., J.I. Maiztegui, C.J. Peters, T.G. Ksiazek, and P.B. Jahrling, *Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever*. Am.J.Trop.Med.Hyg., 1994. **51**(5): p. 554-562.
88. Weissenbacher, M.C., R.P. Laguens, and C.E. Coto, *Argentine hemorrhagic fever*. Curr Top Microbiol Immunol, 1987. **134**: p. 79-116.
89. Maiztegui, J., M. Feuilleade, and A. Briggiler, *Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine Hemorrhagic Fever*. Med Microbiol Immunol, 1986. **175**(2-3): p. 149-52.
90. Maiztegui, J.I. and M.S. Sabattini, *Extension progresiva del area endémica de Fiebre hemorrágica argentina*. Medicina (B. Aires), 1977. **37**: p. 162-166.
91. Ambrosio, A.M., D.A. Enria, and J.I. Maiztegui, *Junin virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever*. Intervirology, 1986. **25**(2): p. 97-102.
92. Romanowski, V., M.L. Pidre, M.L. Ferrelli, C. Bender, and R.M. Gómez, *Argentine hemorrhagic fever*, in *Viral Hemorrhagic Fevers* S.K. Singh, Editor 2013, Taylor & Francis Group CRC Press [<http://www.crcpress.com/>] p. pp 317-337.
93. Enria, D., A.M. Briggiler, and M.R. Feuilleade, *An overview of the epidemiological, ecological and preventive hallmarks of Argentine Hemorrhagic Fever (Junin virus)*. Bull Inst Pasteur, 1998(96): p. 12.
94. Molinas, F.C., M.M. de Bracco, and J.I. Maiztegui, *Coagulation studies in Argentine hemorrhagic fever*. J Infect Dis, 1981. **143**(1): p. 1-6.
95. Pozner, R.G., S. Collado, C. Jaquenod de Giusti, A.E. Ure, M.E. Biedma, V. Romanowski, M. Schattner, and R.M. Gomez, *Astrocyte response to Junin virus infection*. Neurosci Lett, 2008. **445**(1): p. 31-5.
96. Parodi, A.S., G.D. J., H.R. Rugiero, F. M., J.M. De La Barrera, N. Mettler, F. Garzon, M. Boxaca, L. Guerrero, and N. Nota, *Sobre la etiología del brote epidémico de Junín*. Dia Med., 1958. **30**: p. 2300-2301.
97. Parodi, A.S., H.R. Rugiero, D.J. Greenway, N. Mettler, A. Martinez, M. Boxaca, and J.M. De La Barrera, *[Isolation of the Junin virus (epidemic hemorrhagic fever) from the mites of the epidemic area (Echinolaelaps echidninus, Barlese).J*. Prensa Med Argent, 1959. **46**: p. 2242-4.
98. Radoshitzky, S.R., Y. Bao, M.J. Buchmeier, R.N. Charrel, A.N. Clawson, C.S. Clegg, J.L. DeRisi, S. Emonet, J.P. Gonzalez, J.H. Kuhn, I.S. Lukashevich, C.J. Peters, V. Romanowski, M.S. Salvato, M.D. Stenglein, and J.C. de la Torre, *Past, present, and future of arenavirus taxonomy*. Arch Virol, 2015. **160**(7): p. 1851-74.
99. Romanowski, V. and D.H. Bishop, *The formation of arenaviruses that are*

- genetically diploid. *Virology*, 1983. **126**(1): p. 87-95.
100. Salvato, M.S., J.C.S. Clegg, M.J. Buchmeier, R.N. Charrel, J.P. Gonzalez, Lukashevich, I.S., C.J. Peters, and V. Romanowski, *Arenaviridae*, in *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, A.M.Q. King, et al., Editors. 2011, Elsevier-Academic Press: Oxford. p. 715-724.
101. Auperin, D.D., V. Romanowski, M.S. Galinski, and H.L. Bishop, *Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA*. *J.Virol.*, 1984(52): p. 987-904.
102. Ghiringhelli, P.D., R.V. Rivera-Pomar, M.E. Lozano, O. Grau, and V. Romanowski, *Molecular organization of Junin virus S RNA: complete nucleotide sequence, relationship with other members of the Arenaviridae and unusual secondary structures*. *J Gen Virol*, 1991. **72 (Pt 9)**: p. 2129-41.
103. Goni, S.E., J.A. Iserte, A.M. Ambrosio, V. Romanowski, P.D. Ghiringhelli, and M.E. Lozano, *Genomic features of attenuated Junin virus vaccine strain candidate*. *Virus Genes*, 2006. **32**(1): p. 37-41.
104. Lenz, O., J. ter Meulen, H.D. Klenk, N.G. Seidah, and W. Garten, *The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(22): p. 12701-5.
105. York, J., V. Romanowski, M. Lu, and J.H. Nunberg, *The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex*. *J Virol*, 2004. **78**(19): p. 10783-92.
106. Radoshitzky, S.R., J. Abraham, C.F. Spiropoulou, J.H. Kuhn, D. Nguyen, W. Li, J. Nagel, P.J. Schmidt, J.H. Nunberg, N.C. Andrews, M. Farzan, and H. Choe, *Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses*. *Nature*, 2007. **446**(7131): p. 92-6.
107. York, J., S.S. Agnihothram, V. Romanowski, and J.H. Nunberg, *Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein*. *Virology*, 2005. **343**(2): p. 267-74.
108. York, J. and J.H. Nunberg, *Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion*. *J Virol*, 2006. **80**(15): p. 7775-80.
109. York, J. and J.H. Nunberg, *A novel zinc-binding domain is essential for formation of the functional Junin virus envelope glycoprotein complex*. *J Virol*, 2007. **81**(24): p. 13385-91.
110. York, J. and J.H. Nunberg, *Distinct requirements for signal peptidase processing and function in the stable signal peptide subunit of the Junin virus envelope glycoprotein*. *Virology*, 2007. **359**(1): p. 72-81.
111. Burri, D.J., J.R. da Palma, S. Kunz, and A. Pasquato, *Envelope glycoprotein of arenaviruses*. *Viruses*, 2012. **4**(10): p. 2162-81.
112. Morales, M.A., G.E. Calderon, L.M. Riera, A.M. Ambrosio, D.A. Enria, and M.S. Sabattini, *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Junin virus in rodents*. *J Virol Methods*, 2002. **103**(1): p. 57-66.
113. Riera, L.M., M.R. Feuillade, M.C. Saavedra, and A.M. Ambrosio, *Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever*. *Acta Virol*, 1997. **41**(6): p. 305-10.
114. Ure, A.E., P.D. Ghiringhelli, R.D. Possee, S. Morikawa, and V. Romanowski, *Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein*. *J Med Virol*, 2008. **80**(12): p. 2127-33.
115. Lozano, M.E., P.D. Ghiringhelli, V. Romanowski, and O. Grau, *A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junin virus in whole blood samples*. *Virus Res*, 1993. **27**(1): p. 37-53.

116. Vieth, S., C. Drosten, R. Charrel, H. Feldmann, and S. Gunther, *Establishment of conventional and fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assays for detection of pathogenic New World arenaviruses*. J Clin Virol, 2005. **32**(3): p. 229-35.
117. Sanchez, A., D.Y. Pifat, R.H. Kenyon, C.J. Peters, J.B. McCormick, and M.P. Kiley, *Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses*. Journal of General Virology, 1989. **70**: p. 1125-1132.
118. Nakauchi, M., S. Fukushi, M. Saijo, T. Mizutani, A.E. Ure, V. Romanowski, I. Kurane, and S. Morikawa, *Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(8): p. 1132-8.
119. Maiztegui, J.I., K.T. McKee, Jr., J.G. Barrera Oro, L.H. Harrison, P.H. Gibbs, M.R. Feuillade, D.A. Enria, A.M. Briggiler, S.C. Levis, A.M. Ambrosio, N.A. Halsey, and C.J. Peters, *Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group*. J Infect Dis, 1998. **177**(2): p. 277-83.
120. Enria, D.A. and J.G. Barrera Oro, *Junin virus vaccines*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **263**: p. 239-61.
121. Micheloud, G.A., V.V. Gioria, I. Eberhardt, G. Visnovsky, and J.D. Claus, *Production of the Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in stirred reactor and airlift reactor*. J Virol Methods, 2011. **178**(1-2): p. 106-16.
122. Je, Y.H., B.R. Jin, H.W. Park, J.Y. Roh, J.H. Chang, S.J. Seo, J.A. Olszewski, D.R. O'Reilly, and S.K. Kang, *Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies*. Biotechniques, 2003. **34**(1): p. 81-7.
123. Je, Y.H., I.H. Chang, J.Y. Roh, and B.R. Jin, *Generation of baculovirus expression vector using defective Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome maintained in Escherichia coli for Occ+ virus production*. Int. J. Indust. Entomol, 2001. **2**: p. 155-60.
124. Ambrosio, A.M., L. Riera, M.C. Saavedra, and J.J. Sottosanti, *[Neutralization test for lymphocytic choriomeningitis virus for distinguishing between two arenavirus infections in Argentina]*. Rev Argent Microbiol, 2001. **33**(4): p. 235-40.
125. Mahmutovic, S., L. Clark, S.C. Levis, A.M. Briggiler, D.A. Enria, S.C. Harrison, and J. Abraham, *Molecular basis for antibody-mediated neutralization of New World hemorrhagic fever mammarenaviruses*. Cell Host Microbe, 2015. **18**(6): p. 705-13.
126. Molina, G.N., E. Tavarone, O. Taboga, and P. Molinari, *Two Distinctive Phenotypes of AcMNPV Display Different Immune Abilities and Intracellular Destiny*. PLoS One, 2016. **11**(12).
127. Negrotto, S., J.D.G. C, M.J. Laponi, J. Etulain, L. Rivadeneyra, R.G. Pozner, R.M. Gomez, and M. Schattner, *Expression and functionality of type I interferon receptor in the megakaryocytic lineage*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(12): p. 2477-85.
128. Radoshitzky, S.R., J. Abraham, C.F. Spiropoulou, J.H. Kuhn, D. Nguyen, W. Li, J. Nagel, P.J. Schmidt, J.H. Nunberg, N.C. Andrews, M. Farzan, and H. Choe, *Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses*. Nature, 2007. **446**(7131): p. 92-96.
129. Haywood, A.M., *Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 1-5.
130. Reignier, T., J. Oldenburg, B. Noble, E. Lamb, V. Romanowski, M.J. Buchmeier,

- and P.M. Cannon, *Receptor use by pathogenic arenaviruses*. Virology, 2006. **353**(1): p. 111-20.
131. Rojek, J.M. and S. Kunz, *Cell entry by human pathogenic arenaviruses*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 828-35.
132. Helguera, G., S. Jemielity, J. Abraham, S.M. Cordo, M.G. Martinez, J.A. Rodriguez, C. Bregni, J.J. Wang, M. Farzan, M.L. Penichet, N.A. Candurra, and H. Choe, *An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic Fever arenaviruses*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 4024-8.
133. Martinez, M.G., M.A. Bialecki, S. Belouzard, S.M. Cordo, A. Candurra Né, and G.R. Whittaker, *Utilization of human DC-SIGN and L-SIGN for entry and infection of host cells by the New World arenavirus, Junín virus*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(3): p. 612-7.
134. Albarino, C.G., B.H. Bird, A.K. Chakrabarti, K.A. Dodd, D.M. White, E. Bergeron, P. Shrivastava-Ranjan, and S.T. Nichol, *Reverse Genetics Generation of Chimeric Infectious Junin/Lassa Virus Is Dependent on Interaction of Homologous Glycoprotein Stable Signal Peptide and G2 Cytoplasmic Domains*. Journal of Virology, 2010. **85**(1): p. 112-122.
135. Charrel, R.N. and X. de Lamballerie, *Zoonotic aspects of arenavirus infections*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 213-20.
136. Enria, D.A., A.M. Ambrosio, A.M. Briggiler, M.R. Feuillade, and E. Crivelli, *[Candid#1 vaccine against Argentine hemorrhagic fever produced in Argentina. Immunogenicity and safety]*. Medicina (B Aires), 2010. **70**(3): p. 215-22.
137. Ho Je, Y., J. Hee Chang, J. Young Choi, J. Yul Roh, B. Rae Jin, D. O'Reilly, and S. Kwon Kang, *A defective viral genome maintained in Escherichia coli for the generation of baculovirus expression vectors*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(8): p. 575-582.
138. Radoshitzky, S.R., L.E. Longobardi, J.H. Kuhn, C. Retterer, L. Dong, J.C. Clester, K. Kota, J. Carra, and S. Bavari, *Machupo virus glycoprotein determinants for human transferrin receptor 1 binding and cell entry*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21398.
139. Golden, J.W., P. Maes, S.A. Kwilas, J. Ballantyne, and J.W. Hooper, *Glycoprotein-Specific Antibodies Produced by DNA Vaccination Protect Guinea Pigs from Lethal Argentine and Venezuelan Hemorrhagic Fever*. J Virol, 2016. **90**(7): p. 3515-29.
140. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy -- promises, problems and prospects*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 239-42.
141. Gao, R., C.J. McCormick, M.J. Arthur, R. Ruddell, F. Oakley, D.E. Smart, F.R. Murphy, M.P. Harris, and D.A. Mann, *High efficiency gene transfer into cultured primary rat and human hepatic stellate cells using baculovirus vectors*. Liver, 2002. **22**(1): p. 15-22.
142. Hofmann, C., V. Sandig, G. Jennings, M. Rudolph, P. Schlag, and M. Strauss, *Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10099-103.
143. Kost, T.A. and J.P. Condreay, *Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**(4): p. 173-180.
144. Hu, Y.C., *Baculoviral vectors for gene delivery: a review*. Curr Gene Ther, 2008. **8**(1): p. 54-65.
145. Melmed, S., *Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1603-18.
146. Denef, C., J. Lu, and E. Swinnen, *Gamma-MSH peptides in the pituitary: effects, target cells, and receptors*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **994**: p. 123-32.

147. Gottardo, M.F., M.A. Moreno Ayala, S. Zárate, J. Ferraris, M.L. Pidre, P. D., V. Romanowski, M. Candolfi, G. Jaita, and A. Seilicovich, *Signaling pathways involved in the anti-apoptotic effect of Humanin in pituitary cells.*, in *Annual Meeting of the Endocrine Society* 2016: Boston, MA, USA.
148. Barata, P., A.K. Sood, and D.S. Hong, *RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions*. *Cancer Treat Rev*, 2016. **50**: p. 35-47.
149. Fukuhara, H., Y. Ino, and T. Todo, *Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn*. *Cancer Sci*, 2016. **107**(10): p. 1373-1379.
150. Kotterman, M.A., T.W. Chalberg, and D.V. Schaffer, *Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2015. **17**: p. 63-89.
151. O'Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. *Oxford University Press*. 1994: p. 347 pages.
152. Murhammer, D.W., *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, 2008. **388**.